

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

WELLINGTON FABIANO GOMES

**EFEITO MODULADOR DO EXERCÍCIO AERÓBICO SOBRE TNF- α E SEUS
RECEPTORES SOLÚVEIS, IL-6, BDNF, CÉLULAS T E NA
FUNCIONALIDADE DE IDOSAS DA COMUNIDADE COM OSTEARTRITE
DE JOELHO**

Diamantina - MG

2014

WELLINGTON FABIANO GOMES

**EFEITO MODULADOR DO EXERCÍCIO AERÓBICO SOBRE TNF- α E SEUS
RECEPTORES SOLÚVEIS, IL-6, BDNF, CÉLULAS T E NA
FUNCIONALIDADE DE IDOSAS DA COMUNIDADE COM OSTEARTRITE
DE JOELHO**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fisiologia.

Área de Concentração:
Neuroimunoendocrinologia

Orientador:
Prof. Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo

Co-orientadoras:
Prof^a. Dra. Vanessa Amaral Mendonça
Prof^a. Dra. Ana Cristina Rodrigues Lacerda

Diamantina

2014

Ficha Catalográfica - Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Viviane Pedrosa
CRB6-2641

G633e 2014	<p>Gomes, Wellington Fabiano</p> <p>Efeito modulador do exercício aeróbico sobre TNF-α e seus receptores solúveis, IL-6, BDNF, células T e na funcionalidade de idosos da comunidade com osteoartrite de joelho/Wellington Fabiano Gomes. – Diamantina: UFVJM, 2014.</p> <p>125p.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo Coorientadores: Profa. Dra. Vanessa Amaral Mendonça; Profa. Dra. Ana Cristina Rodrigues Lacerda</p> <p>Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p>1. Osteoartrite 2. TNF-α 3. IL-6 4. BDNF IV. Idosas I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 615.82</p>
---------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

EFEITO MODULADOR DO EXERCÍCIO AERÓBICO SOBRE TNF- α E SEUS
RECEPTORES SOLÚVEIS, IL-6, BDNF, CÉLULAS T E NA FUNCIONALIDADE
DE IDOSAS DA COMUNIDADE COM OSTEARTRITE DE JOELHO

Wellington Fabiano Gomes

Tese apresentada ao Programa
Multicêntrico de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas da Sociedade
Brasileira de Fisiologia, nível de
Doutorado, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor.

APROVADA EM 07 / 11 / 2014

Prof.^a Juliana Carvalho Tavares – UFMG

Prof.^a Leani Souza Máximo Pereira – UFMG

Prof. Ronaldo Luis Thomasini – UFVJM

Prof. Hércules Ribeiro Leite – UFVJM

Prof.^a Vanessa Amaral Mendonça – UFVJM

Prof. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo – UFVJM

Presidente

DIAMANTINA

2014

“Alguns anos vivi em Itabira.
Principalmente nasci em Itabira.
Por isso sou triste, orgulhoso: de ferro.
Noventa por cento de ferro nas calçadas.
Oitenta por cento de ferro nas almas.”

Carlos Drummond de Andrade

DEDICATÓRIA

A minha esposa Luciana e aos meus filhos Laura e Ravi: sentido de tudo!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e meus irmãos, por acreditarem sempre!

Ao professor Dr. Gustavo pela orientação e por deixar a imunologia mais leve e prazerosa.

A professora Dra. Vanessa, amiga, incentivadora, compreensiva e dedicada.

A professora Dra. Ana Cristina Lacerda, amiga, determinada, visionária. Se o PMPGCF da UFVJM tem mãe, é ela!

Ao amigo Adriano, pescador, um verdadeiro mestre na arte de conviver.

A todos os professores do programa, em especial aos professores Fabiano Amorim e Etel Vieira.

A todos os professores das instituições parceiras (nucleadoras) em especial aos professores do ICB-UFMG.

A Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis) que proporcionou, com o inovador programa multicêntrico, a estruturação e o sucesso do programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da UFVJM.

A todos os alunos da iniciação científica, em especial Tássio e Bruno.

Aos fisioterapeutas (ex-alunos da iniciação científica) que dedicaram esforços hercúleos para a concretização dos estudos, especialmente Mateus, Sueli, Arthur, Amanda, Daniel e Marcello.

A todos os colegas da pós-graduação do programa e de toda a universidade que crescemos juntos como categoria estudantil e plantamos uma semente de representatividade. Espero que um dia tenhamos uma forte APG (Associação de Pós-graduandos) da UFVJM.

Aos funcionários da PRPPG, em especial Adriana e o pró-reitor Alexandre Christófar, dedicados e competentes.

Aos colegas do LabImuno e BioEx, especialmente Patrícia, Fábio e Wagner.

Aos colegas de departamento de Fisioterapia da UFVJM, pelo apoio durante o meu afastamento, especialmente Adriana Parentoni e Marcus Alcântara.

A UFVJM, especialmente ao magnífico reitor professor Pedro Angelo e ao vice-reitor professor Donaldo, pelo apoio neste período.

Ao médico ortopedista Sérgio e toda a equipe da HNSS.

A Santa Casa de Caridade, em especial ao médico Miguel.

As agências financiadoras (FAPEMIG, CAPES, CNPq) pelos fomentos.

Os professores da banca de qualificação da tese: Dra. Leani Souza Máximo Pereira, Dra. Janetti Nogueira de Francischi, Dr. Cláudio Heitor Baltazar e Dr. Fabiano Trigueiro Amorim.

Os professores da banca de defesa da tese: Dra. Leani Souza Máximo Pereira, Dra. Juliana Carvalho Tavares, Dr. Ronaldo Luis Thomasini, Dr. Hércules Ribeiro Leite e Dra. Etel Rocha Vieira.

E por fim e não menos importante, as voluntárias que participaram da pesquisa.

RESUMO

A osteoartrite de joelho (OAj) é uma doença que afeta principalmente os idosos e pode levar a grandes limitações físicas e funcionais. No entanto, os efeitos específicos da terapia por exercícios, especialmente a caminhada sobre o sistema imunológico, são desconhecidas. Portanto, este estudo teve como objetivo analisar o efeito de 12 semanas de caminhada (3x / semana) no perfil de leucócitos, nos níveis plasmáticos de interleucina (IL-6), do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), dos receptores solúveis de TNF- α (sTNFR1 e sTNFR2), e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) a partir de plasma retirado do sangue periférico de mulheres idosas com OAj. Além disso, as avaliações clínicas e funcionais (teste de WOMAC, teste de caminhada de 6 minutos, SF-36, a percepção da dor) foram realizadas. Dezesseis mulheres (idade: 67 ± 4 anos, índice de massa corporal: $28,07 \pm 4,16 \text{ kg/m}^2$) participaram de um programa de caminhada (36 sessões de fisioterapia) e de um esforço físico (01 sessão de fisioterapia). As variáveis foram avaliadas antes e após 12 semanas de treinamento com duração (30-55 min) e intensidade (70-80% da $FC_{\text{máx}}$) progressivamente maiores. As amostras de sangue coletadas foram analisadas com um contador de células, citômetro de fluxo e pelo método ELISA. As sessões de fisioterapia resultaram em um aumento de 47% da qualidade de vida ($p < 0,05$) e um aumento de 21% no $VO_{2\text{max}}$ ($p < 0,0001$) em mulheres idosas com OAj. Além disso, houve uma redução nas células T $CD4^+$ (antes $46,59 \pm 7\%$, depois $44,58 \pm 9\%$, $p = 0,0189$) e uma intensidade de fluorescência mais elevada para $CD18^+ CD4^+$ (antes $45,30 \pm 10$, depois de $64,27 \pm 33$, $p = 0,0256$) e $CD18^+ CD8^+$ (antes: $64,2 \pm 27$, depois de $85,02 \pm 35$, $p = 0,0130$). A ET aumentou a concentração plasmática de sTNFR1; no entanto, diminuiu a concentração de plasma de sTNFR2, quando comparado com os níveis em repouso de pacientes. O exercício agudo afetou diferencialmente os níveis de sTNFR1 dependente de quando as amostras foram tomadas, antes e após o treinamento aeróbico. No entanto, os níveis de sTNFR2 não foram afetados pelo treinamento. O exercício agudo aumentou os níveis de BDNF apenas antes do período de treinamento de 12 semanas ($p < 0,001$). Além disso, houve aumento das concentrações plasmáticas de BDNF ($p < 0,0001$) e melhora em parâmetros clínicos (funcional $p < 0,001$; percepção da dor $p < 0,01$). A variação dos níveis de receptores solúveis correlacionou-se com a melhora funcional; no entanto, os marcadores inflamatórios de osteoartrite (IL-6 e TNF- α) não foram afetados pelas 36 sessões de fisioterapia. **Palavras-chave:** idosa, osteoartrite, joelho, fisioterapia, funcionalidade, BDNF, IL-6, TNF- α .

ABSTRACT

Osteoarthritis of the knee (kOA) is a disease that mainly affects the elderly and can lead to major physical and functional limitations. However, the specific effects of exercise therapy (ET), specially walking and particularly on the immune system, are unknown. Therefore, this study aimed to analyze the effect of 12 weeks of walking (3x/week) on the leukocyte profile, levels of interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha, (TNF- α), soluble forms of the TNF- α receptor (sTNFR1 and sTNFR2), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) from plasma taken from the peripheral blood of elderly women with kOA. Additionally, clinical and functional assessments (WOMAC test, 6-min walk, SF-36, pain perception) were performed. Sixteen women (age: 67 ± 4 years, body mass index: 28.07 ± 4.16 kg/m²) participated in a walking program and physical exertion. The variables were assessed before and after 12 weeks of training with a progressively longer duration (30-55 min) and higher intensity (70-80% of HR_{max}). The blood samples were collected for analysis with a cell counter, the Scan Fac flow cytometer and were measured by ELISA. The ET resulted in a 47% enhancement of the self-reported quality of life ($p < 0.05$) and a 21% increase in the VO_{2max} ($p < 0.0001$) in elderly women with kOA. Furthermore, there was a reduction in CD4⁺ cells (before $46.59 \pm 7\%$, after $44.58 \pm 9\%$, $p = 0.0189$) and a higher fluorescence intensity for CD18+CD4⁺ (before 45.30 ± 10 , after 64.27 ± 33 , $p = 0.0256$) and CD18+CD8⁺ (before: 64.2 ± 27 , after 85.02 ± 35 , $p = 0.0130$). Aerobic training increased the plasma concentration of sTNFR1; however, it decreased the plasma concentration of sTNFR2, when compared with levels of resting patients. Acute exercise differentially affects the levels of sTNFR1 dependent on when the samples were taken, before and after aerobic training. However, the levels of sTNFR2 were not affected by training. The acute exercise increased the levels of BDNF only before the 12-week training period ($p < 0.001$). Moreover, the training augmented the plasma concentrations of BDNF ($p < 0.0001$) and improved clinical parameters (functional $p < 0.001$; pain perception $p < 0.01$). The variation in the levels of soluble receptors correlated with functional improvement; however, the inflammatory osteoarthritis markers (IL-6 and TNF- α) were unaffected by the walking exercises, in physical therapy. **Keywords:** aged, osteoarthritis, knee physiotherapy, functionality, BDNF, IL-6, TNF- α .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Índice de Envelhecimento do Brasil entre os anos de 1970 e 2010	17
Figura 2	- Composição da população residente total – Brasil	18
Figura 3	- Desenho esquemático da osteoartrite	22
Figura 4	- Fluxograma de participação das voluntárias no estudo.....	29
Figura 5	- Posicionamento padrão para realização da incidência radiográfica	32
Figura 6	- Teste de esforço em esteira ergométrica	36
Figura 7	- Estratégia de análise utilizada para os experimentos com citometria .	39
Figura 8	- Estratégia de análise para avaliar a densidade de expressão do receptor na superfície celular	40
Figura 9	- Gráfico representativo do protocolo de esforço físico	44
Figura 10	- Terapia por exercício em grupo	45
Figura 11	- Materiais utilizados	46
Figura 12	- Programa de terapia por exercício	47
Figura 13	- Classificação da osteoartrite de joelho	50
Figura 14	- Domínios do questionário WOMAC	52
Figura 15	- Domínios do questionário SF-36	53
Figura 16	- TC6M e EVD antes e após terapia por exercícios	54
Figura 17	- Concentrações plasmáticas de sTNFR1 e sTNFR2.....	54
Figura 18	- Correlação entre sTNFR1 e Função Física e TC6M	56
Figura 19	- BDNF antes do treinamento (esforço físico)	57
Figura 20	- BDNF antes e após a terapia por exercícios	57
Figura 21	- Análise fenotípica dos leucócitos circulantes no sangue periférico de idosas	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Critérios para diagnóstico de osteoartrite de joelho segundo o ACR (<i>American College of Rheumatology</i>)	31
Tabela 2	- Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos	38
Tabela 3	- Protocolo Experimental	43
Tabela 4	- Dados clínicos e demográficos das voluntárias	49
Tabela 5	- Descritores dos efeitos da intervenção fisioterápica	51
Tabela 6	- Concentrações plasmáticas de citocinas e receptores solúveis	55
Tabela 7	- Contagem celular	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A

- AIVD - Atividades de vida diária
- AVD - Atividades instrumentais de vida diária

C

- COPESE - Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão

D

- DP - Desvio padrão

E

- ESF - Estratégia de Saúde da Família
- EVD - Escala Visual de Dor

F

- FC_{max} - Frequência cardíaca máxima

I

- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IE - Índice de envelhecimento
- IL-6 - Interleucina 6
- IMC - Índice de massa corporal

K

- kVp - Quilovolt pico

M

- mA - Miliampére
- mAs - Miliampére-segundo
- ml - Mililitros
- MEEM - Mini Exame do Estado Mental
- MET - Taxa de equivalente metabólico

O

- OA - Osteoartrite
- OAj - Osteoartrite de joelho

P

- PAD - Pressão arterial diastólica
- PAS - Pressão arterial sistólica
- PMPGCF - Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas
- PSE - Percepção subjetiva do esforço físico

S

- SBFis - Sociedade Brasileira de Fisiologia
- SF-36 - *Medical Outcomes Study 36 – Item Short-Form Health Survey*
- SNC - Sistema nervosa central
- SNP - Sistema nervoso periférico
- sTNFR1 - Receptor solúvel de fator de necrose tumoral alfa tipo 1
- sTNFR2 - Receptor solúvel de fator de necrose tumoral alfa tipo 2

T

- TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
- TC6M - Teste de caminhada de seis minutos

U

- UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
- UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

V

- VO₂ max - Volume de Oxigênio (O₂) máximo

W

- WOMAC - *Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*

SUMÁRIO

PREFÁCIO	15
1 – INTRODUÇÃO	
1.1 Envelhecimento Populacional.....	16
1.2 Envelhecimento Biológico e Funcional	19
1.3 Osteoartrite.....	21
1.4 Componentes Moleculares e Celulares da Inflamação	
1.4.1 Citocinas e receptores solúveis.....	23
1.4.2 BDNF.....	24
1.4.3 Células e componentes de membranas.....	24
1.5 Tratamento Fisioterápico	25
2 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	27
3 – MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Amostra.....	29
3.2 Instrumentos.....	33
3.3 Procedimentos.....	42
3.4 Análise Estatística.....	48
4 – RESULTADOS.....	49

5 – DISCUSSÃO.....	60
6 – CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

APÊNDICES

Apêndice 1: “ <i>Effect of aerobic training on plasma cytokines and soluble receptors in elderly women with knee osteoarthritis, in response to acute exercise</i> ”	76
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Apêndice 2: “ <i>Effect of exercise on the plasma BDNF levels in elderly women with knee osteoarthritis</i> ”	85
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Apêndice 3: “ <i>Aerobic training modulates T cells activation in aged with knee osteoarthritis</i> ”	93
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Apêndice 4: TCLE	109
------------------------	-----

Apêndice 5: Questionário clínico, sócio demográfico	110
-----------------------------------------------------------	-----

ANEXOS

Anexo 1: Carta de Aprovação do CEP	113
------------------------------------------	-----

Anexo 2: Mini Exame do Estado Mental (MEEM)	114
---------------------------------------------------	-----

Anexo 3: Questionário SF-36.....	116
----------------------------------	-----

Anexo 4: Questionário WOMAC	123
-----------------------------------	-----

Anexo 5: Percepção subjetiva do esforço (PSE)_Escala de Borg.....	125
-------------------------------------------------------------------	-----

PREFÁCIO

Esta tese de doutorado foi elaborada de acordo com as Normas para Redação e Apresentação de Teses e Dissertações da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), descritas na resolução número 11 (16 de maio de 2008) do Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão (CONSEPE) e de acordo com o Regulamento Geral (15 de abril de 2013) do Programa Multicêntrico da Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PMPGCF), coordenado e proposto pela Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis). A sua estrutura compreende sete seções: 1.Introdução, 2.Justificativa e Objetivos, 3.Material e Métodos, 4. Resultados, 5. Discussão, 6.Conclusões e Considerações Finais e 7.Referências Bibliográficas.

A primeira seção contém a introdução geral que compreende a revisão da literatura e o delineamento dos marcos teóricos envolvidos. Os artigos científicos, processos e ao mesmo tempo produtos finais desta tese, estão disponibilizados como apêndices: **Apêndice 1**_*Effect of aerobic training on plasma cytokines and soluble receptors in elderly women with knee osteoarthritis, in response to acute exercise*_ publicado em 2012 pelo periódico *Clinical Rheumatology* (DOI 10.1007/s10067-011-1927-7). **Apêndice 2**_*Effect of exercise on the plasma BDNF levels in elderly women with knee osteoarthritis*_ publicado em 2014 pelo periódico *Rheumatology International* (DOI 10.1007/s00296-013-2786-0). **Apêndice 3**_ *Aerobic training modulates T cells activation in aged with knee osteoarthritis*_ redigido de acordo com as normas do periódico AGE, enviado em agosto de 2014 e aguardamos o parecer dos revisores.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento Populacional

O Brasil é um país que envelhece a passos amplos e rápidos. Para a professora Berlindes (KÜCHEMANN, 2012) as alterações na dinâmica populacional são claras, inequívocas e irreversíveis. Segundo o censo demográfico realizado em 2010 (IBGE, 2011) a população brasileira é oficialmente de 190.755.799 pessoas, sendo que 51%, o equivalente a 97 milhões, corresponde a mulheres.

O índice de envelhecimento (IE) da população brasileira é calculado segundo o número de pessoas com 60 e mais anos de idade, para cada 100 pessoas menores de 15 anos de idade na população residente em determinado espaço geográfico. Em suma quanto maior o índice, mais avançado é o estágio ou maior a progressão do envelhecimento da população analisada (figura 1) e quando há um aumento do grupo jovem maior do que o aumento dos idosos, o índice acusa o rejuvenescimento da população. (CLOSS; SCHWANKE, 2012)

Estes índices recentes, de 2010, em uma análise temporal retroativa estão em elevação e refletem a participação crescente de idosos em relação aos jovens na população brasileira, o que é consequência, principalmente, da redução dos níveis de fecundidade e do aumento da esperança de vida dos idosos. As regiões Sudeste e Sul, que se encontram mais adiantadas no processo de transição demográfica, apresentam os maiores índices. Os valores mais baixos nas regiões Norte e Centro-Oeste refletem principalmente a influência das migrações, atraindo pessoas em idades jovens, muitas vezes acompanhadas de seus filhos (IBGE, 2013). No período entre 1970 e 2010, observa-se que o IE brasileiro apresentou aumento progressivo: de 1970 a 1980, teve variação de 30,54%; de 1980 a 1991, de 32,26%, de 1991 a 2000 variou 37,42% e de 2000 a 2010, 55,11% (CLOSS; SCHWANKE, 2012).

Alguns autores definem o IE como o melhor indicador do envelhecimento demográfico e consideram um valor menor 15 como indicativo de uma população jovem; entre 15 e 30, uma população em nível intermediário; e acima de 30, uma população idosa. De acordo com esta classificação, a população do Brasil, de suas

regiões (exceto a Norte), bem como de 19 estados brasileiros, pode ser considerada idosa. (CLOSS; SCHWANKE, 2012)

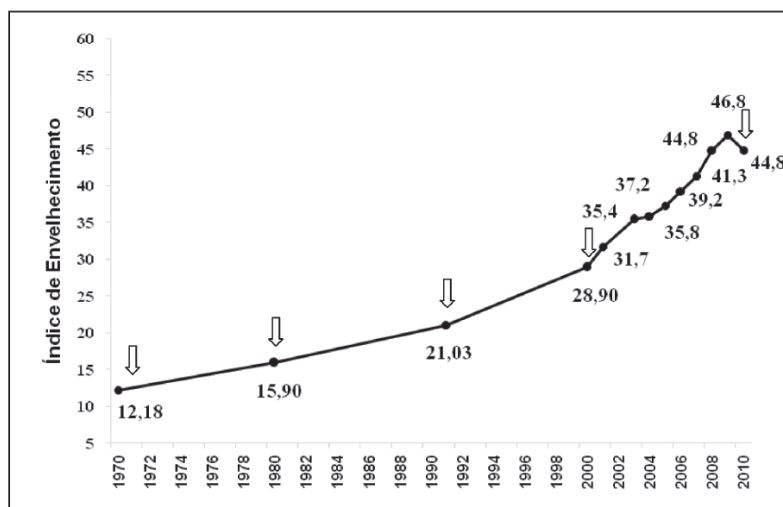


Figura 1: Índice de Envelhecimento do Brasil entre os anos de 1970 e 2010. Fonte: “A evolução do índice de envelhecimento no Brasil, nas suas regiões e unidades federativas no período de 1970 a 2010”; Vera Elizabeth Closs e Carla Helana Augustin Schwanke (2012).

A pirâmide etária da população brasileira (figura 2) apresenta um acentuado estreitamento da base, ao mesmo tempo em que o ápice se torna cada vez mais largo, quando comparados os dados dos anos 1991, 2000 e 2010. Como dito anteriormente, isto é decorrente do contínuo declínio dos níveis de fecundidade observados no Brasil e, em menor parte, da queda da mortalidade no período. O alargamento do topo da pirâmide pode ser observado pelo crescimento da participação relativa da população com 65 anos e mais, que era de 4,8% em 1991, passando a 5,9% em 2000 e chegando a 7,4% em 2010. Em última análise, o crescimento absoluto da população do Brasil nestes últimos dez anos se deu principalmente em função do crescimento da população adulta, com destaque também para o aumento da participação da população idosa. (IBGE, 2011)

Outro destaque importante acerca dos dados observados na transição demográfica brasileira é a análise sob a ótica de gênero. Constata-se um processo de feminização da velhice, ou seja, quanto mais a população envelhece, mais feminina ela se torna. Hoje, as mulheres representam 55,5% da população idosa brasileira e 61% do contingente de idosos acima de 80 anos. Este maior contingente feminino resulta da maior expectativa de vida das mulheres que, em média, vivem oito anos a mais que os

homens. Dentre os fatores que concorrem para esse fenômeno, especialistas destacam as mortes violentas (assassinatos e acidentes) cujas vítimas, quando jovens e adultas, são homens em mais de 90% dos casos e o acompanhamento médico contínuo maior entre as mulheres do que entre os homens ao longo de suas vidas (DAVIDSON; DIGIACOMO; MCGRATH, 2011; KÜCHEMANN, 2012).

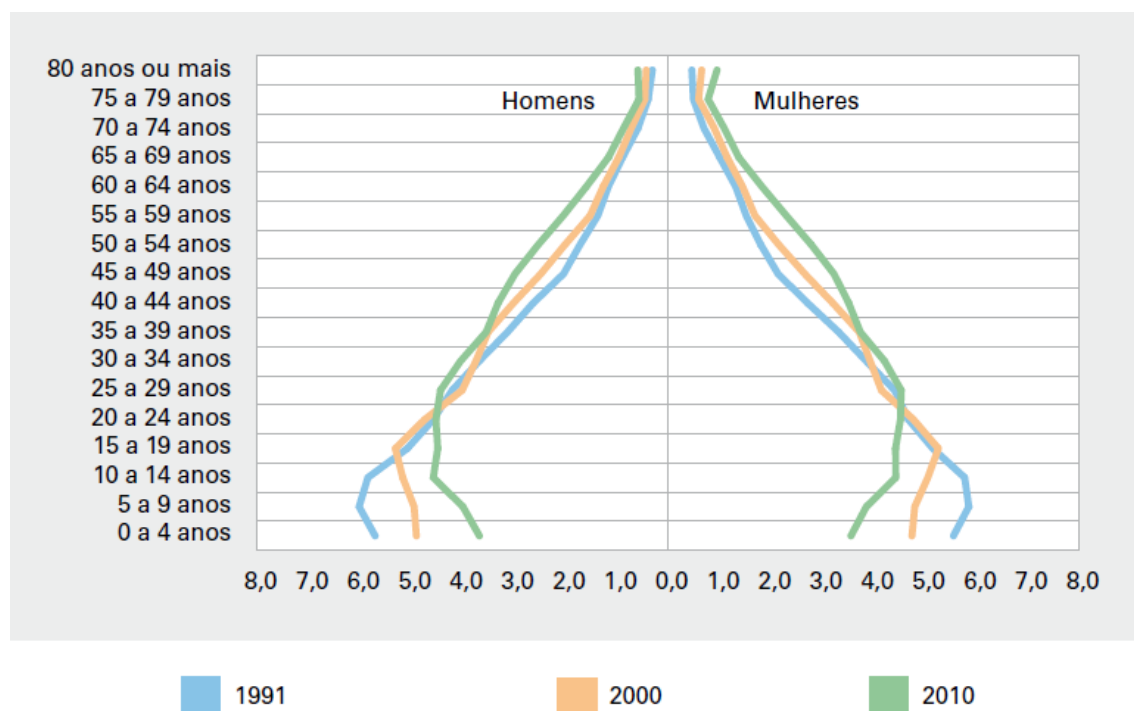


Figura 2: Composição da população residente total, por sexo e grupos de idade - Brasil - 1991/2010
Fonte: IBGE, Sinopse do Censo Demográfico 2010.

Portanto é evidente que o grupo de idosos é, hoje, um contingente populacional expressivo em termos absolutos e de crescente importância relativa no conjunto da sociedade brasileira, daí decorrendo uma série de novas exigências e demandas em termos de políticas públicas de saúde e inserção ativa dos idosos na vida social (CLOSS; SCHWANKE, 2012).

1.2 Envelhecimento Biológico e Funcional

O envelhecimento do corpo, e em última análise de suas células, é um caminho natural da existência humana e de qualquer outro ser vivo. As alterações do sistema imune relacionadas à idade são denominadas imunossenescência, que se refere a uma diminuição da eficiência do sistema imune, especificamente do sistema imune adaptativo. A característica marcante da imunossenescência é a alteração nas populações de linfócitos T, fundamentais na resposta imune. Uma das características do sistema imunitário do idoso é a involução do timo, que sofre uma alteração histológica, uma vez que o tecido linfoide é gradualmente substituído pelo tecido adiposo, o que provoca diminuição progressiva na capacidade de proliferação de linfócitos T (MALAGUARNERA *et al.*, 2001; ROCHA; REIS; TEIXEIRA, 2010).

Com a imunossenescência as células perdem sua capacidade de produzir clones e sua função de defesa encontra-se alterada, além disso, a contínua exposição a antígenos causa um estresse antigênico crônico e acúmulo de células T de memória/efetoras e exaustão das células T virgens. Por fim o envelhecimento é caracterizado por um processo inflamatório crônico peculiar, que parece ser geneticamente controlado e provoca um acúmulo de lesões moleculares e celulares. (FRANCESCHI *et al.*, 2007)

O termo “inflammaging”, introduzido inicialmente por Franceschi (FRANCESCHI *et al.*, 2007), define um estado inflamatório crônico, sistêmico e de baixa intensidade que ocorre com o envelhecimento, ou seja, uma inflamação decorrente do envelhecimento e associada ao processo de imunossenescência. Não existe um termo específico na língua portuguesa, porém poderia ser algo da aglutinação das palavras inflamação e senilidade, como “inflamasenilidade” ou “seninflamação”. Este processo é caracterizado pelo aumento em até quatro vezes das concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias (IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15 e TNF- α), pode contribuir para maior predisposição a doenças infecciosas e para o aparecimento e/ou agravamento de doenças crônicas, como é o caso da osteoartrite (ROCHA; REIS; TEIXEIRA, 2010). O mecanismo subjacente ao aumento da produção e liberação dessas citocinas ainda não é conhecido, mas diferentes fatores parecem estar relacionados, como presença de doenças crônicas, diminuição de esteroides sexuais, fatores psicossociais e aumento do tecido adiposo (KRABBE; PEDERSEN;

BRUUNSGAARD, 2004). A presença de estresse psicológico, depressão e fatores socioeconômicos também são associados às alterações nas concentrações de mediadores inflamatórios, indicando uma relação entre os sistemas imunológico e neuroendócrino (KIECOLT-GLASER *et al.*, 2003).

O aumento nos níveis circulantes de TNF- α , IL-6, receptor solúvel para IL-2 (sIL-2R) e proteína C-reativa (PCR) e níveis baixos de albumina vêm sendo apontados como preditores de mortalidade (KRABBE; PEDERSEN; BRUUNSGAARD, 2004). Além disso, o aumento nos processos inflamatórios relacionados ao envelhecimento pode ser responsável por situações comumente observadas nos idosos, como osteopenia, anemia e sarcopenia culminando inclusive em um fenótipo de síndrome de fragilidade (descrito abaixo). E o exercício físico tem papel fundamental no controle deste processo, tornando o envelhecimento do sistema imune um processo naturalmente mais eficiente na resolução das infecções e dos processos inflamatórios (SIMPSON, 2011).

Este cenário de idosas brasileiras com hábitos de vida, de resiliência e de nutrição distintos dos observados em países desenvolvidos, associado ao fato da ocorrência de alterações provenientes do envelhecimento dos sistemas imune e neuroendócrino e as consequentes alterações funcionais e de qualidade de vida, pode ser agravado e muito com a presença de uma doença articular, como a osteoartrite.

1.3 Osteoartrite

A osteoartrite (OA) é uma doença articular crônico-degenerativa, na qual, dentre as articulações de sustentação do peso corporal, o joelho é a mais frequentemente afetada. O conhecimento da fisiopatologia da osteoartrite de joelho (OAj) tem avançado consideravelmente nos últimos anos, especificamente em relação ao processo inflamatório da doença, mas ainda tem-se muito a esclarecer (BIJLSMA; BERENBAUM; LAFEVER, 2011; FELSON, 2006).

Como destacado anteriormente, com o envelhecimento populacional, que acontece aceleradamente no Brasil, teremos rapidamente um grande número de idosos e muitos destes com doenças crônicas como a OAj (CALDAS, 2003; FELSON, 2006). A alta prevalência desta e outras doenças crônico-degenerativas associadas aos baixos níveis socioeconômicos e baixa escolaridade dificultam o gerenciamento do tratamento e de políticas públicas eficazes de intervenções preventivas (WONG; CARVALHO, 2006).

A OAj apresenta maior incidência, prevalência e gravidade nas mulheres em relação aos homens (THOMAS; PEAT; CROFT, 2014). Inicialmente a OAj era tratada como uma doença não inflamatória, mais popularmente conhecida como artrose, e nas últimas décadas o papel da sinovite, das alterações ósseas e musculares tem ganhado destaque, dentro do contexto imune e neuroendócrino. O declínio do desempenho muscular e da integridade dos demais tecidos periarticulares somados ao déficit sensorial parecem estar diretamente relacionados à gravidade e progressão da doença (WU; HENRY, 2012). Especificamente, a articulação do joelho apresenta alteração da remodelação e da distribuição de forças no osso subcondral, e frequentemente nos casos mais graves apresenta osteófitos, espessamento da cápsula articular, frouxidão dos ligamentos e fraqueza dos músculos periarticulares (figura 3). É uma doença que envolve, portanto, toda articulação e também os tecidos adjacentes podendo ser descrita como a “falência articular”(ARDEN; NEVITT, 2006; FELSON, 2006).

Cronologicamente as mudanças teciduais iniciam-se com alteração da matriz cartilaginosa, avançam para fibrilação e erosão da cartilagem hialina e finalmente ocorre a produção de proteases e citocinas, estimuladas pela fagocitose dos subprodutos da degradação (BIJLSMA; BERENBAUM; LAFEVER, 2011; MARTELPelletier, 2004).

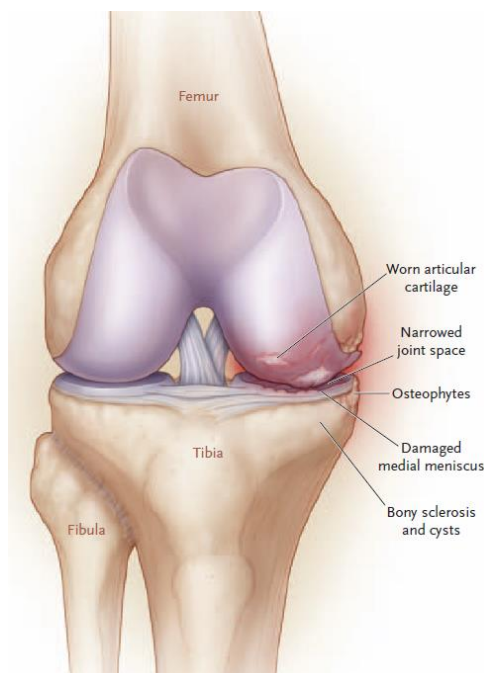


Figura 3: Desenho esquemático da osteoartrite do compartimento medial de joelho esquerdo, com destaque para alterações em algumas estruturas articulares (osso, cartilagem e menisco). Adaptado de “Osteoarthritis of knee” (FELSON, 2006).

Não se pode contextualizar a OAj sem destacar o papel da angiogênese. Este é um processo em que se desenvolvem novos vasos sanguíneos a partir dos vasos pré-existente em virtude de uma nova demanda circulatória criada pela destruição articular. Segundo Bonnet (BONNET; WALSH, 2005), esses vasos recém-formados estimulariam a produção de citocinas inflamatórias que por sua vez acelerariam a degradação articular, criando um ciclo de estímulo crônico entre inflamação e angiogênese. Assim, o processo inflamatório desencadeia a angiogênese aumentando o número de macrófagos que ao sensibilizarem outras células levam a formação de osteófitos, mantendo um ciclo crônico através dos mediadores inflamatórios (como IL-6 e TNF- α) (WALSH, D A, 1999).

1.4 Componentes Celulares e Moleculares da Inflamação Articular

O avanço científico deve elucidar os principais componentes e mecanismos biológicos envolvidos no processo inflamatório de baixo grau da OAj sendo a chave para o conhecimento e o adequado tratamento da doença. Contudo biomarcadores específicos para a OAj não tenham sido qualificados por órgãos reguladores internacionais, apesar de grandes associações apresentadas na literatura, principalmente nos últimos anos (GOLDRING; OTERO, 2011; HUNTER *et al.*, 2014). As citocinas e seus receptores solúveis tem demonstrado serem alguns destes componentes, que detectados no sangue periférico, podem sinalizar sobre o estágio da OAj e conseguinte sobre os efeitos das intervenções terapêuticas (PENNINX; ABBAS, 2004).

1.4.1 Citocinas e receptores solúveis

As citocinas são proteínas secretadas por leucócitos inflamatórios e por células não leucocíticas que agem como mediadores intercelulares. As citocinas diferem dos hormônios clássicos no sentido de que elas são produzidas por vários tecidos ou tipos celulares e não por glândulas especializadas. Elas geralmente agem localmente de modo parácrino ou autócrino em vez de endócrino. São produzidas na periferia por uma variedade de células do sistema imunológico, como os monócitos, macrófagos, linfócitos e células Natural Killer. São também produzidas por outros tipos celulares como células endoteliais, musculares, fibroblastos e adipócitos. Além disso, elas são também produzidas no Sistema Nervoso Central (SNC) por micróglia e astrócitos. No Sistema Nervoso Periférico (SNP) as citocinas coordenam a resposta imunológica e no cérebro são responsáveis pela ativação neuroendócrina e neuronal (HAALAND *et al.*, 2008).

As interleucinas de 1 a 19 (IL-1 a IL 19), os interferon (α , β , γ), o fator de necrose tumoral (TNF), o fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator β de transformação do crescimento (TGF) são exemplos de citocinas. Especificamente a interleucina 6 (IL-6) tratada como uma miocina, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e os receptores solúveis do fator de necrose tumoral alfa tipo um (sTNFR1) e tipo dois (sTNFR2) são moduladores da inflamação e são influenciados pelo exercício físico. (HAALAND *et al.*, 2008; PENNINX; ABBAS, 2004; WALSH, NEIL P *et al.*, 2011)

1.4.2 BDNF

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma proteína da família dos fatores neurotróficos e está envolvida na diferenciação, sobrevivência e desenvolvimento de populações neuronais específicas (BINDER, 2004). Esta proteína é encontrada principalmente nos tecidos do sistema nervosa central e periférico, além do tecido muscular (VEDOVELLI *et al.*, 2011; YAMAMOTO; GURNEY, 1990). BDNF previne a morte neuronal relacionada ao stress (SCHÄBITZ *et al.*, 2007) e também atua na maturação dos neurônios (LINDSAY, 1994). O BDNF parece apresentar um papel modulador negativo na inflamação (MAKAR *et al.*, 2008), podendo ser inclusive produzido pelas células do músculo esquelético ou pelas próprias células do sistema imune na situação do exercício físico (CORREIA; SCORZA; SILVA, 2011).

1.4.3 Células e componentes de membranas

As células T, que se desenvolvem no timo, são classificadas em duas classes principais_ as células T citotóxicas e as células T auxiliares ou helper (Th). Quando ativadas por uma célula apresentadora de antígeno, uma célula T auxiliar virgem pode diferenciar-se em vários tipos distintos de células T auxiliares efectoras, como Th1, Th2, Th9, Th17 e Treg.

As citocinas, cuja produção é modulada pelas células T, são polipeptídios de baixo peso molecular produzidos a partir diversas células estimuladas: macrófagos, linfócitos, células endoteliais, musculares, fibroblastos e adipócitos. São responsáveis por regular e modular as respostas imunológicas, inibindo ou estimulando a ativação, proliferação, diferenciação de diversos tipos celulares, regulando a secreção de anticorpos e de outros mediadores, consequentemente controlando o processo inflamatório. (ABBAS; LICHTMAN, 2005; COLLAZIOL *et al.*, 2004)

1.5 Tratamento Fisioterápico

Inúmeros tratamentos são propostos para as pessoas com OAj, especialmente o tratamento fisioterápico (HOCHBERG *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2010) e na perspectiva imunológica, a prescrição de exercícios para estes pacientes deve constar de atividades regulares leves (HAALAND *et al.*, 2008; WALSH, NEIL P *et al.*, 2011).

A realização regular de exercícios tem sido apontada como uma ação preventiva da mortalidade, das doenças cardiovasculares e do diabetes tipo 2 (PETERSEN; PEDERSEN, 2005). O treinamento moderado resulta numa maior porcentagem de células T CD4⁺ no timo, baço e sangue após o exercício (MASTRO *et al.*, 1999). Além disso, a atividade física moderada realizada em longo prazo modula a síntese de citocinas, como a IL-2, que são importantes reguladores da resposta imunológica, podendo desacelerar o processo de imunossenescência e promovendo consequente melhora na qualidade de vida de pessoas idosas (DRELA; KOZDRON; SZCZYPIORSKI, 2004).

Dentro desse contexto, vários programas de exercícios foram propostos na literatura. No entanto, ainda não existe consenso em relação a um programa que seja efetivo, considerando a intensidade, a duração e a modalidade de treino aeróbico e a sua associação com as citocinas inflamatórias, BDNF e células T.

Especificamente, a IL-6 é uma citocina multifuncional, de ação pró e anti-inflamatória. William Ershler denominou em 1993 a IL-6 como sendo a “citocina dos gerontologistas” devido a sua associação com o catabolismo celular e sua relação com o envelhecimento (ERSHLER, 1993), além de outras mais recentemente associadas (ROUBENOFF, 2014). Durante o exercício físico, em consequência direta da contração muscular, há produção de IL-6 (miocina), cuja liberação é acompanhada pela produção de citocinas anti-inflamatórias tal como a IL-10, promovendo a inibição sistêmica da ação do TNF- α e outras citocinas inflamatórias (PEDERSEN, 2011). Outro mecanismo pelo qual o exercício poderia reduzir os mediadores inflamatórios seria pelo seu efeito na gordura e peso corporal, uma vez que o tecido adiposo tem sido apontado como uma importante fonte de produção de citocinas especialmente TNF- α (MOHAMED-ALI *et al.*, 1999).

Neste contexto, o exercício aeróbico poderia ser mais efetivo para a redução dos mediadores inflamatórios por seus efeitos sobre a gordura corporal quando comparado

aos exercícios resistidos (OBERBACH *et al.*, 2008). Sem mencionar a facilidade e popularidade do exercício de caminhada em nosso meio, que pode ser atribuída ao fato de ser uma intervenção promotora de saúde isenta de custos consideráveis. Caminhar é um exercício de grande adesão, não requer local específico para prática, sendo a atividade física aeróbia de mais fácil acesso e também pode ser uma atividade automonitorada e ainda apresenta ainda benefícios de ordem psicológica com acréscimo de vitalidade e vigor, podendo potencializar o contato entre indivíduos (HAALAND *et al.*, 2008).

Estudos tem demonstrado o efeito de exercícios regulares (2 ou 3 vezes por semana) em intensidade moderada na melhora da resposta do sistema imunológico com efeito anti-inflamatório (PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Especificamente o exercício induz efeito imunomodulador, como mudanças no número e na função das células sanguíneas (neutrófilos, B, T, NK e monócitos do sangue periférico), bem como influencia o tráfego das células entre o sangue e os tecidos-alvos, como os linfócitos em indivíduos hígidos (WALSH, NEIL P *et al.*, 2011; WITARD *et al.*, 2012).

Apesar de evidências sugerirem que o exercício aeróbico é efetivo em reduzir os sintomas da osteoartrite de joelho (OAj), novos estudos são necessários a fim de avaliar o efeito de intervenções terapêuticas, por exemplo, terapia por exercício composta de caminhada (intensidade controlada pela frequência cardíaca), no componente inflamatório da doença em idosas comunitárias com OA de joelho.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O indiscutível envelhecimento populacional brasileiro, a feminização da velhice, a alta prevalência e potencial incapacitante da osteoartrite de joelho, além dos divergentes entendimentos dos efeitos da terapia por exercícios sustentaram e direcionaram a ideia inicial desta tese e todo o seu desenvolvimento.

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito imunomodulador da intervenção fisioterápica (terapia por exercício composta de caminhada) em idosas da comunidade com osteoartrite de joelho.

Objetivos específicos:

Distinguir os efeitos imunomoduladores causados por uma sessão de fisioterapia (efeito agudo do esforço físico) dos causados por acompanhamento regular (efeito crônico da terapia por exercício composta por caminhada durante 12 semanas, 3x/semana) em idosas com osteoartrite de joelho;

Quantificar as concentrações plasmáticas de citocinas (IL-6, TNF α) e receptores solúveis (sTNFR1, sTNFR2) de idosas com osteoartrite de joelho e as possíveis modificações diante do exercício agudo (esforço físico) e diante do exercício crônico (terapia por exercício composta por caminhada durante 12 semanas, 3x/semana);

Quantificar a produção de fator neurotrófico (BDNF) no plasma de idosas com osteoartrite de joelho e as possíveis modificações diante do exercício agudo (esforço físico) e diante do exercício crônico (terapia por exercício composta por caminhada durante 12 semanas, 3x/semana);

Quantificar a população de células T (CD4⁺, CD8⁺), células T ativadas (CD4⁺CD28⁺, CD8⁺CD28⁺) e intensidade de ativação (CD4⁺CD18⁺, CD8⁺CD18⁺) no plasma de idosas com osteoartrite de joelho e as possíveis modificações diante do exercício agudo (esforço físico) e diante do exercício crônico (terapia por exercício composta por caminhada durante 12 semanas, 3x/semana);

Verificar o efeito da intervenção fisioterápica (terapia por exercício composta de caminhada 3 vezes por semana, durante 12 semanas) no desempenho físico-funcional, na qualidade de vida, na percepção da dor de idosas com osteoartrite de joelho e analisar suas correlações com os parâmetros biológicos relacionados à inflamação.

Pergunta do estudo:

Um programa fisioterápico constituído por exercício de caminhada é capaz de modificar o fenótipo das células T regulatórias, a produção de citocinas e seus receptores solúveis e de fatores neurotróficos, e isto já pode ser observado no primeiro atendimento?

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo prospectivo, quasi-experimental, foi desenhado para analisar o efeito de uma intervenção em idosas comunitárias com OAj (PAGE, 2012). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, nº057/08 (anexo 1).

3.1 Amostra

Um estudo piloto, pré-experimental, foi realizado para se verificar a exequibilidade do delineamento da pesquisa, o andamento de todo o processo de coleta dos dados e o cálculo amostral. As voluntárias deste grupo específico ($n=5$) não foram incluídas no estudo subsequente, mas concluíram o tratamento como as demais, e sem quaisquer intercorrências. O cálculo amostral ($n=16$) foi realizado com os resultados das variáveis deste grupo preliminar, sendo que para variável “teste de caminhada de 6 minutos” o número mínimo de voluntárias era quatorze e para “consumo máximo de oxigênio” um número mínimo de onze voluntárias. Adicionando ao valor máximo (14) uma margem de segurança para caso de perdas (02) obtivemos o número de 16 voluntárias para o estudo. Das 108 voluntárias contatadas para fazer parte do estudo, 63 foram consideradas elegíveis após seleção por telefone. Destas voluntárias elegíveis 16 foram selecionadas para a pesquisa conforme observado no fluxograma da Figura 4.

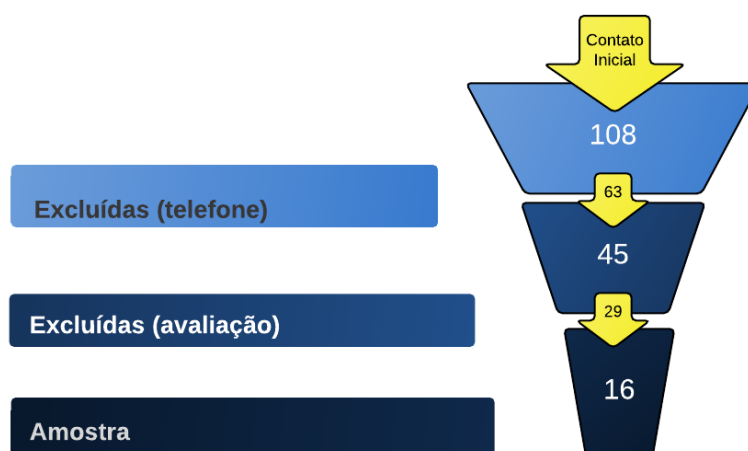


Figura 4. Fluxograma de participação das voluntárias no estudo.

Optou-se pela amostra exclusiva do gênero feminino pelo processo de feminização da velhice, já descrito na introdução e que pode ser resumida pelo fato de que quanto mais a população envelhece, mais feminina ela se torna. Já para a determinação da idade das voluntárias, sabe-se que são consideradas idosas as pessoas com mais de 65 anos em países desenvolvidos e aquelas com idade de 60 anos e mais em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil. Estes parâmetros foram reafirmados pela *Second World Assembly on Ageing*, realizada em 2002 (UN, 2002) e para manter a coerência com os demais indicadores e também para atender ao Estatuto do Idoso (Lei nº.10.741, de 1º de outubro de 2003) (BRASIL, 2007), utilizou-se nesta tese o parâmetro de 60 anos e mais como critério de inclusão.

Além de ser do gênero feminino e ter idade igual e superior a 60 anos, para participar do estudo, as voluntárias deveriam atender aos demais critérios de inclusão: ter diagnóstico de osteoartrite em pelo menos um dos joelhos, baseado nas normativas clínicas e radiográficas do *American College of Rheumatology* (ALTMAN *et al.*, 1986) como apresentado na tabela 01, não ter sofrido trauma recente nos joelhos, não utilizar qualquer dispositivo de auxílio à locomoção (bengalas, muletas, andadores), não ter se submetido a nenhum tipo de tratamento fisioterapêutico ou qualquer outro procedimento de reabilitação para membros inferiores nos últimos três meses, bem como não utilizar medicações imunossupressoras, anti-inflamatório esteroidal ou beta-bloqueadores. Também não foram incluídos aqueles que apresentavam doenças ortopédicas, neurológicas, respiratórias ou cardíacas que pudessem impedir a realização dos exercícios propostos. Foram excluídos aqueles que apresentavam déficit cognitivo sugerido por um escore inferior àqueles compatíveis com a sua escolaridade ao realizarem o Mini-exame do Estado Mental (Mini-mental) (BRUCKI; NITRINI; CARAMELLI, 2003) e aqueles que praticavam atividade física três vezes por semana com duração de 30 minutos e mais (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2000).

Tabela 01: Critérios para diagnóstico de osteoartrite de joelho segundo o ACR
(*American College of Rheumatology*)

Clínico e laboratorial	Clínico e radiológico	Clínico
Dor no joelho	Dor no joelho	Dor no joelho
+	+	+
Pelo menos 5 dos 9 critérios:	Pelo menos 1 dos 3 critérios:	Pelo menos 3 dos 6 critérios:
✓ Idade > 50 anos	✓ Idade > 50 anos	✓ Idade > 50 anos
✓ Rigidez < 30 minutos	✓ Rigidez < 30 minutos	✓ Rigidez < 30 minutos
✓ Crepitação	✓ Crepitação	✓ Crepitação
✓ Sensibilidade óssea		✓ Sensibilidade óssea
✓ Alargamento ósseo	+	✓ Alargamento ósseo
✓ Calor não palpável		✓ Calor não palpável
✓ TSE < 40 mm/h	Osteófitos ao exame de	
✓ RF < 1:40	raios-X	
✓ LS-OA		
92% sensibilidade	91% sensibilidade	95% sensibilidade
75% especificidade	86% especificidade	69% especificidade

TSE= taxa de sedimentação de eritrócitos; FR= fator reumatóide; LS-OA= líquido sinovial típico de osteoartrite (esbranquiçado, viscoso, ou com contagem de glóbulos brancos < 2.000/mm³). (ALTMAN *et al.*, 1986)

Avaliação Radiográfica e Classificação do Grau de OAj

A avaliação radiográfica foi utilizada no presente estudo para confirmar o diagnóstico clínico da OAj e classificá-la quanto ao grau de acometimento segundo os critérios de Kellgren e Lawrence (KELLENGREN; LAWRENCE, 1957). Todas as voluntárias incluídas no estudo foram submetidas a exame radiográfico (61,5 kVp, 80 mA, e 6,4 mAs) do joelho mais sintomático a fim de classificar o grau da OA. As incidências radiográficas foram realizadas em uma clínica radiológica no município de Diamantina respeitando o eixo pósterio-anterior com a voluntária em ortostatismo, a patela tocando o filme, os joelhos flexionados a 30°, a tíbia na posição vertical, mantendo o músculo quadríceps femoral o mais relaxado possível e os pés paralelos (DAVIES; GLASGOW, 2000) conforme observado na figura 05. A classificação radiológica segundo os critérios de Kellgren e Lawrence (1957) foi realizada por examinador que desconhecia o estado clínico das voluntárias (KELLENGREN; LAWRENCE, 1957). São quatro os níveis de gravidade: Grau I (Duvidoso): com pequenos osteófitos e significância clínica duvidosa; Grau II (Médio): com osteófitos claros e redução leve do espaço articular; Grau III (Moderado): com redução moderada do espaço articular; Grau IV (Grave): com grande redução do espaço articular com esclerose subcondral. Esta classificação foi usada exclusivamente para descrição da amostra e realizada por um profissional médico, com ampla experiência na técnica classificatória.

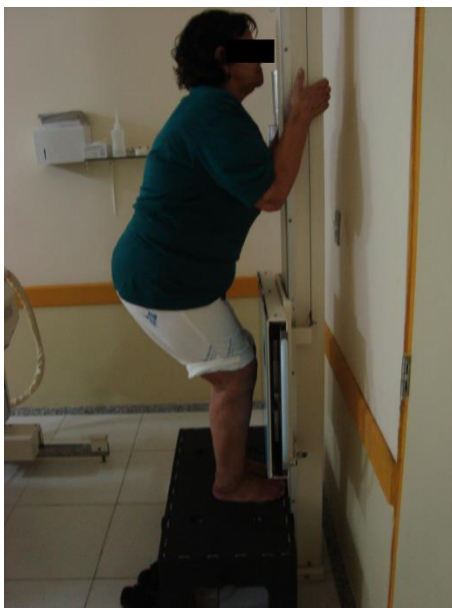


Figura 05: Posicionamento padrão para realização da incidência radiográfica.

3.2 Instrumentos

3.2.1 Mini Exame do Estado Mental (MEEM)

O MEEM foi publicado inicialmente por Folstein (FOLSTEIN; FOLSTEIN; MCHUGH, 1975) e desde então se tornou um importante instrumento de rastreio de comprometimento cognitivo, tanto na prática clínica quanto em pesquisas. Em 1994, Bertollucci e seus colaboradores (BERTOLUCCI *et al.*, 1994) publicaram uma versão adaptada à população brasileira. Em nosso estudo o MEEM foi utilizado como critério de exclusão. (Anexo 2)

Este instrumento é composto por várias categorias que incluem a memória, orientação espacial e temporal, capacidade de julgamento, resolução de problema e raciocínio; com 19 itens para pontuação e escore máximo de 30. Estas categorias avaliam habilidades cognitivas específicas como a orientação temporal (5 pontos), orientação espacial (5 pontos), registro de três palavras (3 pontos), atenção e cálculo (5 pontos), recordação das três palavras (3 pontos), linguagem (8 pontos) e capacidade construtiva visual (1 ponto). O escore do MEEM pode variar de um mínimo de zero, que indica o maior grau de comprometimento cognitivo dos indivíduos, até um total de 30 pontos, que por sua vez, corresponde à melhor capacidade cognitiva.

Desde sua publicação algumas modificações têm sido propostas, principalmente em relação à influência do nível educacional em relação ao escore total do MEEM. No presente estudo foram utilizadas as adaptações sugeridas por Brucki e colaboradores (BRUCKI; NITRINI; CARAMELLI, 2003). Esses autores observaram que a escolaridade foi o principal fator que influenciou o desempenho dos indivíduos no teste. Os escores medianos para o ponto de corte de acordo com o nível de escolaridade propostos foram: analfabetos, 20; 1 a 4 anos de estudo, 25; 5 a 8 anos de estudo, 26; 9 a 11 anos de estudo, 28 e acima de 11 anos de estudo, 29 pontos. As modificações sugeridas por esses autores mostraram ter uma boa aplicabilidade clínica em diferentes ambientes e em estudos populacionais, tornando-se um instrumento homogêneo e uniformizando os resultados.

3.2.2 Índice de massa corporal (IMC)

O IMC foi utilizado no presente estudo como variável controle, uma vez que, uma alteração na composição corporal poderia afetar diretamente a sobrecarga articular no joelho e também a produção de citocinas pró-inflamatórias e assim interferir diretamente nos resultados obtidos. O mesmo é expresso pela relação entre a massa corporal em quilogramas (kg) dividida pela estatura em metros elevada à segunda potência (m^2). Para tanto, a estatura e o peso foram mensurados em uma balança com estadiômetro (marca Welmy; modelo 110) com as voluntárias em ortostatismo, descalças ou usando apenas meias, distribuindo o peso igualmente sobre os dois pés, e a cabeça posicionada alinhada no plano horizontal. Os principais pontos de corte utilizados foram os preconizados pela Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995), sendo normal valores de IMC entre 18,5 e 24,99 Kg/m^2 , valores de $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$ para definição de sobrepeso e $\geq 30 \text{ Kg/m}^2$ para a definição de obesidade.

3.3.3 Questionário WOMAC

As variáveis dor, rigidez articular e funcionalidade foram avaliadas com os 24 itens do questionário *Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index* (WOMAC), que é um instrumento válido e confiável, específico para OA. O Womac é um questionário composto por três domínios [Seção A – Dor (5 questões), Seção B – Rigidez (2 questões) e Seção C – Atividade Física (17 questões)], cujas questões devem ser respondidas de acordo com a percepção de dor, rigidez articular e nível de função física (funcionalidade) percebidas pela voluntária nas últimas 72 horas (Anexo 4). Os escores do WOMAC são apresentados em escala Likert, na qual cada questão recebe um escore que varia de 0 a 100, distribuído da seguinte forma: nenhuma = 0; leve = 25; moderada = 50; grave = 75; extrema = 100. Somam-se os valores de todas as voluntárias em cada questão, obtém-se a média e os valores são apresentados para cada seção ou domínio. O questionário WOMAC foi originalmente proposto por Bellamy e colaboradores (BELLAMY *et al.*, 1988) e adaptado para população brasileira por Fernandes (FERNANDES, 2003).

3.3.4 Teste de caminhada de seis minutos (TC6M)

Inicialmente o TC6M foi desenvolvido para testar a tolerância ao exercício de indivíduos com doença respiratória crônica e insuficiência cardíaca. O teste já foi usado como uma medida da capacidade funcional em outras populações, incluindo idosos saudáveis, pessoas submetidas a artroplastias e fibromialgia.

O TC6M mede a distância que um indivíduo é capaz de andar sobre um total de seis minutos em uma superfície firme e plana. O objetivo é que o indivíduo caminhe o mais longe possível em seis minutos, mantendo um ritmo determinado por ele mesmo. Este teste foi desenvolvido em 1963 por Balke (BALKE, 1963) e testado e indicado para uso em diferentes populações devido à sua reprodutibilidade e facilidade de administração, inclusive para osteoartrite (BENNEL; DOBSON; HINMAN, 2011).

Antes da realização do teste as voluntárias permaneceram em repouso por dez minutos e foram instruídas a usarem roupas e calçados confortáveis. O teste foi realizado em um espaço padronizado, com formato retangular e medida de 54 metros quadrados (9 x 6 metros), com superfície plana e piso antiderrapante. Imediatamente antes e após a realização do teste foram coletados os dados de pressão arterial, frequência respiratória, frequência cardíaca e percepção subjetiva do esforço físico (PSE) pela Escala de Borg. A voluntária foi solicitada a caminhar por trajeto previamente delimitado com a maior velocidade possível, durante os seis minutos. Durante a caminhada, o examinador aplicava estimulação verbal a cada minuto, sempre utilizando o mesmo tom de voz e frases padronizadas: “você está indo muito bem, faltam cinco minutos” e assim por diante, cada um minuto. O indivíduo foi orientado a interromper o teste caso apresentasse dores em membros inferiores, taquicardia, tontura ou qualquer outro sintoma de desconforto. Além disso, foram realizadas duas repetições do teste visando eliminar o efeito de aprendizagem e assegurar a reprodutibilidade do procedimento. Ao final, a média das duas medidas foi registrada (DU *et al.*, 2009).

3.3.5 Teste de desempenho físico na esteira

Um teste de esforço progressivo em esteira foi realizado tanto para avaliar a condição física da voluntária [estimação do consumo máximo de oxigênio ($VO_{2\text{ max}}$) para prescrição do treinamento] como para a intervenção necessária (esforço físico) para avaliação do efeito agudo do exercício. Foi utilizado o protocolo de esteira modificado

de Naughton (NAUGHTON; SEVELIUS; BALKE, 1963). Os detalhes serão apresentados logo adiante. (Figura 6)



Figura 6: Teste de esforço em esteira ergométrica: A) local e equipamento; B) posicionamento das voluntárias.

3.3.6 Qualidade de Vida

A qualidade de vida foi avaliada por um pesquisador previamente treinado através do questionário *Medical Outcomes Study 36 – Item Short-Form Health Survey* (SF-36) antes e após o período de terapia por exercício de 12 semanas. Trata-se de um questionário multidimensional e genérico, formado por 36 itens que avalia oito dos principais domínios relacionados à saúde: capacidade funcional, aspectos físicos, dor corporal, estado geral de saúde, vitalidade, aspectos sociais, aspectos emocionais e saúde mental.

Esse questionário foi validado e adaptado à população brasileira (Ciconelli, 1999) e demonstrou validade e boa reprodutibilidade intra e inter observador (0,5 a 0,8 e 0,6 a 0,8 respectivamente). Para cada domínio, a pontuação varia entre 0 (pior estado de saúde) e 100 (melhor estado de saúde), portanto uma maior pontuação obtida indica uma melhor qualidade de vida. (Anexo 3)

Os domínios avaliam: A) Aspectos Físicos (04 itens): as limitações quanto ao tipo e quantidade de trabalho, bem como quanto essas limitações dificultam a realização do trabalho e das atividades da vida diária. B) Dor (02 itens): a presença de dor, sua

intensidade e sua interferência nas atividades da vida diária e ocupacionais. C) Estado Geral de Saúde (05 itens): como o paciente se sente em relação a sua saúde global. D) Vitalidade (04 itens): o nível de energia e de fadiga. E) Aspectos Sociais (02 itens): a integração do indivíduo em atividades sociais. F) Aspectos Emocionais (03 itens): o impacto de aspectos psicológicos no bem-estar do paciente. G) Saúde Mental (05 itens): ansiedade, depressão, alterações no comportamento ou descontrole emocional e bem-estar psicológico. Há também uma avaliação comparativa entre a percepção do paciente de seu estado geral de saúde atual e o de um ano atrás (01 item) mas que não recebe pontuação específica.

3.3.7 Imunofenotipagem celular por citometria de fluxo

A análise da série branca foi feita seguindo o método de imunofluorescência recomendado pela Becton Dickinson (USA), modificado como a seguir: 50 µL de amostra de sangue em EDTA, foi incubada com um coquetel de anticorpos monoclonais (mAbs) específicos, conjugados com fluorocromo (ficoeritrina-PE ou Isotiocianato de fluoresceína-FITC), direcionado para diversos marcadores de superfície celular (tabela 2). A incubação ocorreu em ambiente protegido da luz, por 20-30 minutos e à temperatura ambiente. Após a incubação, os eritrócitos foram lisados usando-se 100 µL de solução de lise (Optilyse-B, Immunotec-USA) por 5 minutos, seguido de adição de água destilada e reincubação por 10 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com 1 µL de tampão (PBS) 0,015 M contendo 0,01% de azida sódica. O preparado celular foi fixado com 500µL de “FACS fix solution” (10 g/L paraformaldeído, 1% de cacodilato sódico, 6,65 g/L cloreto de sódio e 0,01% de azida sódica). A aquisição dos dados foi feita com o instrumento FACScan (Becton-Dickinson, USA), utilizando o programa Cell-Quest para o estoque e análise dos dados. Este procedimento foi realizado no laboratório de Imunologia da UFVJM, sob supervisão do Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo.

A identificação das populações celulares de interesse, a determinação do valor percentual de populações e subpopulações linfocitárias e a análise da densidade de expressão de moléculas de superfície foi realizada utilizando-se o programa Cell-Quest. A figura 7 mostra, de forma esquemática, a sequência de procedimentos adotados para a análise do valor percentual de cada célula de interesse, pela citometria de fluxo. O primeiro passo constituiu na identificação da população de linfócitos. Para isso, foram

Tabela 2 Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações celulares e moléculas de superfície

Anticorpos monoclonais	Especificidade
Controle Isotópico G1CL - FITC	-
Controle Isotópico G1CL - PE	-
Anti-CD3 humano marcado com PE	Fenotipagem de linfócitos T
Anti-CD4 humano marcado com FITC	Fenotipagem de subpopulação de linfócitos T
Anti-CD8 humano marcado com FITC	Fenotipagem de subpopulação de linfócitos T
Anti-CD16 humano marcado com PE	Fenotipagem de células NK e subpopulação de linfócitos T
Anti-CD19 humano marcado com PE	Fenotipagem de linfócitos B
Anti-HLA-DR humano marcado com PE	Fenotipagem da ativação de linfócitos T
Anti-CD28 humano marcado com PE	Fenotipagem da via de co-ativação de linfócitos T
Anti-CD18 humano marcado com PE	Fenotipagem da via de adesão celular

Anticorpos monoclonais (Becton-Dickinson, USA).

utilizados gráficos de distribuição pontual (dot plot) onde a população de interesse ocupa uma região característica após ajustes de ganhos de seu tamanho-FSC e granulosidade-SSC (R1, Figura 7-A). Após a seleção da região de interesse, analisamos a emissão de fluorescência apresentada pelas células presentes nesta região através de gráficos de distribuição pontual de fluorescência 1 (FL1) versus fluorescência 2 (FL2) (Figura 7-B). Para cada quadrante (superior esquerdo, superior direito, inferior esquerdo e inferior direito) são obtidos valores percentuais, que representam uma fração de células com o fenótipo específico definido pela marcação com os anticorpos monoclonais utilizados.

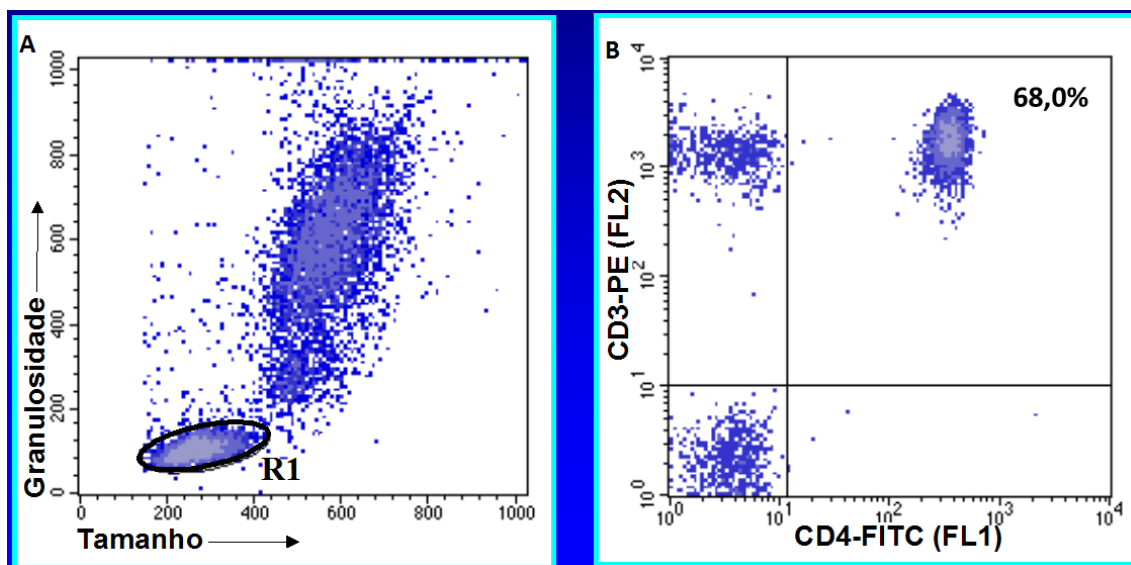


Figura 7: Estratégia de análise utilizada para os experimentos com citometria: selecionada a população de interesse, nesse caso os linfócitos, em gráficos de distribuição puntual de tamanho versus granulidade (A). Dentro dessa população selecionada, utilizamos gráficos de fluorescência verde versus fluorescência laranja, correspondente aos anticorpos monoclonais utilizados, para definirmos as populações de interesse (B). No exemplo aqui mostrado, temos a população de linfócitos $CD3^+CD4^+$, e representa o percentual de linfócitos TCD4 dentro da população de linfócitos totais.

A sequência de procedimentos utilizados na análise da expressão do marcador CD18 e CD28 nas subpopulações de linfócitos T está representado na figura 8. A avaliação foi feita determinando-se o canal médio de fluorescência (cmf), que representa a intensidade de luz total emitida pela excitação do fluorocromo associado aos anticorpos monoclonais ligados à superfície celular. As populações celulares foram selecionadas através de gráficos de distribuição puntual em função do tamanho e granulidade celulares (FSC x SSC). Em seguida, utilizando-se histogramas em escala logarítmica, determinou-se uma região R2 para a população de interesse. A expressão de CD18 na superfície das células da região R2 selecionada foi realizada utilizando-se histogramas em escala linear.

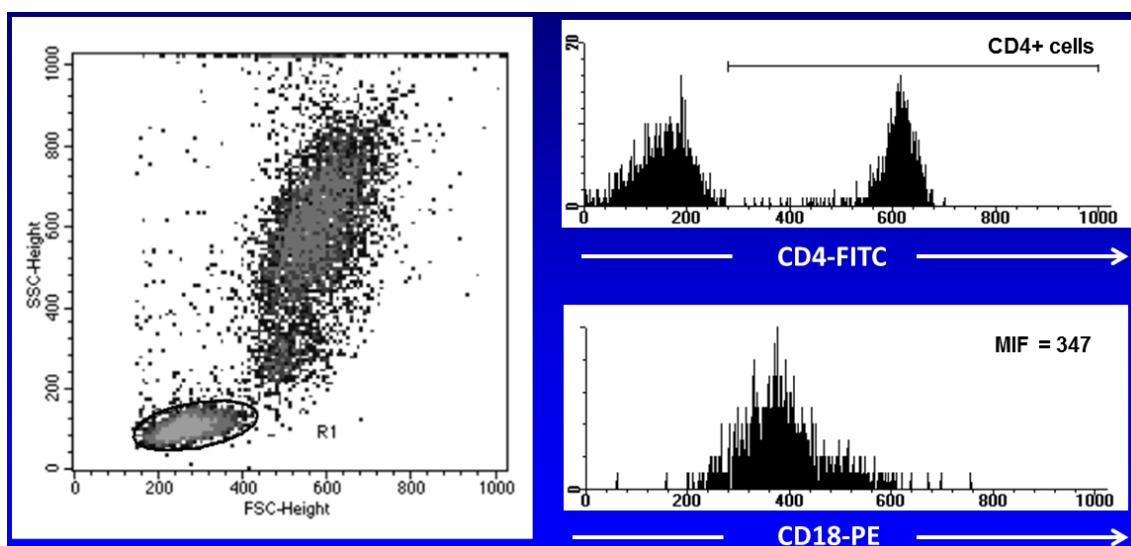


Figura 8: Estratégia de análise para avaliar a densidade de expressão do receptor na superfície celular por meio da intensidade média de fluorescência (MFI). Após selecionada a população de interesse, nesse caso os linfócitos positivos para CD4, foi avaliada a densidade da expressão de receptores, aqui exemplificado o receptor CD18, na superfície celular. Os resultados foram expressos como densidade média de fluorescência

3.6.8 Medidas de TNF- α , IL-6, sTNFR1, sTNFR2 e BDNF

As amostras foram coletadas utilizando-se heparina como anticoagulante e o plasma separado e estocado a -70°C até o seu uso para análise através da técnica de ELISA sanduíche.

A cada poço foram adicionados 100 μL de anticorpo monoclonal contra TNF- α , IL-6, sTNFR1, sTNFR2 e BDNF (R&D Systems) diluídos em PBS contendo 0,1% de albumina de soro bovino – BSA (SIGMA) sendo estas placas incubadas por 12 horas à temperatura ambiente. Anticorpos não aderidos às placas foram descartados, por inversão e sucessivas lavagens em PBS – Tween, e as placas bloqueadas com 200 μL / poço de uma solução contendo PBS - BSA 1%, durante 1 hora a 37°C . A seguir as placas foram novamente lavadas.

As amostras foram diluídas e aplicadas em um volume de 100 μL para cada poço. Paralelamente, as amostras investigadas foram diluídas em várias concentrações para estabelecimento de uma curva padrão. Foi efetuada incubação por 12 horas à temperatura ambiente. Os anticorpos secundários, após a lavagem dos poços, foram diluídos em PBS – BSA 0,1% e incubados por duas horas à temperatura ambiente.

Finalmente, 100 μL de estreptoavidina ligada a peroxidase na diluição de 1: 4000 em PBS – BSA 0,1% foi adicionada à placa e a mesma foi mantida sob agitação por trinta minutos.

O cromógeno utilizado foi o OPD (0-phenylenediamine – SIGMA) na diluição de 4 mg para 10 μL de tampão citrato. No momento da aplicação de 100 μL desta solução nos poços, foram adicionados 2 μL /placa de H_2O_2 30 volumes como catalisador da reação. Após vinte minutos de incubação em ausência de luz, a reação foi cessada adicionando-se 50 μL de H_2SO_4 1M por poço. A leitura da intensidade de marcação foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda de 490 nm (SOFTmaxPro – versão 2.2.1).

O processo de análise foi realizado no Laboratório de Imunofarmacologia do ICB/UFMG, sob a supervisão da Dra. Vanessa Amaral Mendonça. E os limites de detecção para estes ensaios foram 5 pg/ μL para TNF- α , sTNFR1, sTNFR2 e BDNF e 0,14 pg/ μL para IL-6.

3.3 Procedimentos

Os procedimentos experimentais foram realizados na Clínica Escola de Fisioterapia da UFVJM e no serviço de urgência da Santa Casa de Caridade de Diamantina-MG. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE _Apêndice 3), as voluntárias foram avaliadas por pesquisadores previamente treinados, inicialmente com a aplicação do questionário clínico, sócio demográfico (Apêndice 4) e depois com todo o processo avaliativo, de intervenção e acompanhamento descritos na tabela 03.

Para se conseguir a composição da amostra, 108 idosas com osteoartrite de joelho foram recrutadas por meio de lista de espera da Clínica Escola de Fisioterapia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), hospitais locais, postos de saúde, consultórios médicos e programas de Estratégia de Saúde da Família (ESF) da cidade de Diamantina, Minas Gerais. Após o contato inicial e a realização de anamnese para verificação dos critérios e inclusão e exclusão, a maioria das voluntárias foi excluída por fazer uso de medicamentos incompatíveis com a pesquisa e também por não obter valores mínimos no exame para rastreio do estado mental.

A verificação da confiabilidade da consistência interna da medida intra-avaliador foi verificada por meio do cálculo do coeficiente alfa de Cronbach (α) realizado previamente ao estudo propriamente dito. Para tanto, foram realizadas medidas das variáveis: WOMAC, TC6M, VO_{2max} e SF-36. Como resultado, uma vez que o coeficiente foi de: 0,837 para o WOMAC; 0,858 para o TC6M; 0,950 para o VO_{2max} e 0,977 para o SF-36, concluímos que houve consistência interna entre as medidas de muito boa a excelente.

Avaliações Prévias		Exercício Crônico																Exercício Agudo (Após)			
		SEMANAS																			
-02	MEEM Raio-X IMC Anamnese	-01		00 Antes	*01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12*	+01		+02		
		Pré	Pós 30'														Após	Pré	Pós 30'		
		6 ml de sangue															6 ml sangue	6 ml de sangue	6 ml de sangue		
		PSE PA FC	WOMAC SF-36 TC6M EVD														WOMAC SF-36 TC6M EVD	PSE PA FC			
Descritores:		Esforço Físico (Pós-Pré)		Terapia por Exercício (Após – Antes)														Esforço Físico (Pós-Pré)		Repouso (Pré-30')	

Tabela 3. Protocolo Experimental distribuído em 17 semanas (da semana -02 até a semana +02). Composto das avaliações prévias, de duas avaliações do exercício agudo (antes e após a terapia por exercício) e do exercício crônico de 12 semanas. *Início e término da terapia por exercício. MEEM: Mini Exame do Estado Mental; IMC: Índice de massa corporal; PSE: Percepção subjetiva do esforço físico; PA: Pressão arterial; FC: Frequência cardíaca; EVD: Escala visual de dor; WOMAC: Questionário *Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*; TC6M: Teste de caminhada de seis minutos; SF-36: *Questionário Medical Outcomes Study 36 – Item Short-Form Health Survey*.

3.3.1 Exercício agudo (esforço físico)

Como descrito anteriormente o esforço físico, teste de esforço em esteira (NAUGHTON, 1964), foi utilizado como parâmetro para análise do efeito agudo do exercício como também para determinar a condição física das voluntárias (figura 9). As voluntárias foram instruídas a terem uma boa noite de sono anterior ao teste, a usarem roupas e calçados confortáveis, a ingerirem 500 ml de água e evitarem atividades cansativas 24 horas antes dos testes. Além disso, as voluntárias foram orientadas a manter a dieta normal e nenhuma restrição alimentar foi proposta pelos pesquisadores ao longo do estudo. (SAWKA *et al.*, 2007)

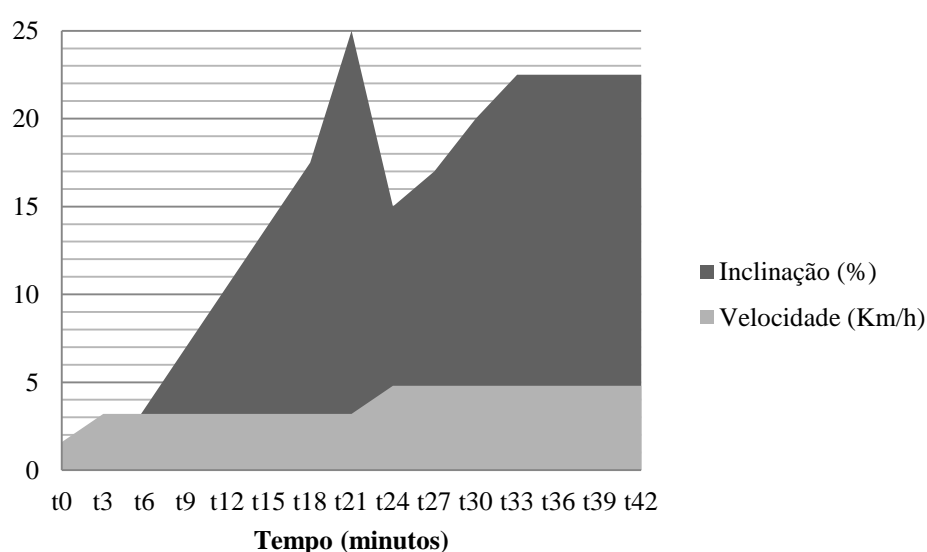


Figura 9: Gráfico representativo do protocolo de esforço físico em esteira com variação da velocidade (Km/h) e da inclinação em porcentagem (%) em função do tempo (t) com variações a cada 3 minutos (t0: tempo zero, ... , t42: tempo 42 minutos). (NAUGHTON; SEVELIUS; BALKE, 1963; NAUGHTON, 1964)

Durante o teste, a frequência cardíaca foi mensurada usando um monitor cardíaco (Polar, modelo F4) e registrada a cada 30 segundos. A percepção subjetiva do esforço (PSE), classificada de acordo com a Escala de Borg foi determinada a cada três minutos (BORG, 1982; CHEN; FAN; MOE, 2002) (Anexo 5). A amostra biológica constituiu-se de três coletas de 6ml de sangue total, coletadas de forma asséptica, utilizando heparina como anticoagulante: pré-exercício, pós-exercício e após 30 minutos de repouso (recuperação).

Os critérios adotados para a interrupção do teste foram: fadiga voluntária ou percepção de esforço definida como 18 na PSE (CHEN; FAN; MOE, 2002), em caso de

tonturas, náuseas, visão turva, dispneia, dor torácica, aumento da pressão arterial diastólica (PAD) acima de 120 mmHg, queda sustentada da pressão arterial sistólica (PAS) ou elevação acentuada da PAS próximo a 240 mmHg. Esses procedimentos foram realizados no serviço de urgência da Santa Casa de Caridade de Diamantina, sempre no turno da manhã, e os testes foram realizados pelos pesquisadores com a presença de um médico plantonista.

A estimativa do $VO_{2\text{ max}}$ foi realizada de acordo com o grau de inclinação e a velocidade durante o último estágio do teste concluído pelo sujeito de acordo com a equação abaixo (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2000):

$$VO_2 = (0,1 \times \text{velocidade}) + (1,8 \times \text{velocidade} \times \text{grau de inclinação}) + 3.5$$

3.3.2 Exercício crônico

As sessões de terapia por exercício foram realizadas em um espaço previamente delimitado e padronizado, sempre no turno da tarde, com monitoramento da temperatura ambiente ($22,95 \pm 6,72$ °C) e da umidade relativa do ar ($47,26 \pm 16,83$ %). As atividades em grupo ocorriam em um ginásio coberto de 40 m² (8 x 5 metros), as voluntárias eram orientadas a utilizarem calçados e roupas apropriadas (figura 10) e tinham acesso ilimitado à água para hidratação (figura 11).



Figura 10: Terapia por exercício em grupo composta de exercícios preparatórios (alongamentos), caminhada na faixa de frequência cardíaca alvo e exercícios de resfriamento (caminhada em intensidade regressiva).

Essas sessões tiveram a frequência de três vezes semanais, por um período de doze semanas e eram controladas e sua intensidade incrementada no domínio do tempo

(30 até 55 minutos) e da porcentagem da frequência cardíaca máxima (70% até 80% da FC_{max}) como descrito na figura 13. Esta intensidade da caminhada foi monitorada por meio de um monitor cardíaco (Polar, modelo F4). (CHODZKO-ZAJKO *et al.*, 2009).

Uma sessão de terapia por exercícios foi dividida em três fases:

- 1 – Exercícios preparatórios (5 minutos): com alongamento dos membros inferiores, seguido de uma caminhada de baixa intensidade;
- 2 – Treinamento propriamente dito (30 – 55 minutos): constituído por caminhada na frequência cardíaca alvo individual;
- 3 – Exercícios de resfriamento (5 minutos): que consistia de caminhada de baixa intensidade em ritmo confortável.



Figura 11: Materiais utilizados para controle das condições ambientais (temperatura e umidade relativa do ar), dos parâmetros de intensidade (tempo e % da FC_{max}) e para hidratação das voluntárias.

Cada voluntário tinha um controle clínico da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso (antes da sessão) e de recuperação (após a sessão) em todas as

sessões. Além disso, durante cada sessão o valor de frequência cardíaca de cada voluntária era averiguado e registrado em intervalos de 3 minutos. Para garantir a manutenção do treinamento dentro da faixa previamente determinada [Frequência Cardíaca Alvo (FC_a) \pm 5 bpm] cada voluntária recebia estímulos verbais para aceleração ou desaceleração do ritmo da caminhada. Os grupos de treinamento eram compostos por 5 ou 3 voluntárias, sendo que 3 ou 2 caminhavam em sentido horário e a(s) outra(s) 2 ou 1 no sentido contrário, e a cada 10 minutos esse sentido era invertido.

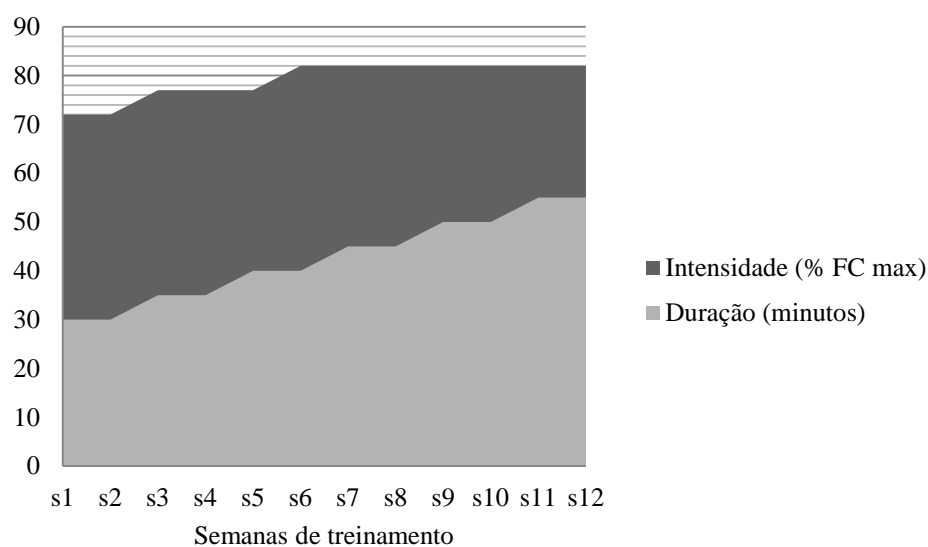


Figura 12. Programa de terapia por exercício_ três vezes por semana, 12 semanas (s1: semana um, ... , s12: semana doze), controlado pelo tempo (duração em minutos) e pela intensidade (frequência alvo de cada voluntária com progressão gradual segundo a porcentagem da FC_{max}).

3.4 Análise Estatística

Análises descritivas e testes de normalidade (Shapiro-Wilk) foram realizados para as variáveis de interesse, utilizando o pacote estatístico SPSS 18.0 for Windows (Chicago Illinois Software) e os testes e gráficos produzidos com o pacote estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Executou-se o teste ANOVA fatorial com parcelas subdivididas (2 x 3) com Post Hoc de Bonferroni, considerando um nível de significância estatística de 5% (valor- α = 0,05) e o teste T Student.

4. RESULTADOS

Todas as voluntárias selecionadas (n=16) completaram o programa de terapia por exercício (análise do efeito crônico), contudo uma voluntária não realizou a segunda avaliação do esforço físico (análise do efeito agudo) por desistência espontânea (n=15). A média de idade deste grupo amostral é de 67 anos, conforme descrição mais detalhada do seu perfil disposta na tabela 4. Além disso, elas não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre o IMC antes do treinamento e após o treinamento. As dezesseis voluntárias do estudo apresentaram uma adesão ao programa de treinamento de 91,67%, com média de sessões concluídas de 33 para um total de 36 previstas.

Tabela 4. Dados clínicos e demográficos das voluntárias (n=16)

		Média	DP
Idade (anos)		67	±4
Massa (Kg)		66,9	±11,8
Altura (m)		1,54	±0,07
IMC (Kg/m ²)	Antes-treinamento	28,13	±3,85
	Após-treinamento	27,74*	±4,06

IMC: índice de massa corporal; DP: desvio padrão; *p>0,05

Quase 70% das idosas tinham osteoartrite de joelho confirmada por exame radiográfico, classificadas de acordo com os critérios de Kelgreen e Lawrence (KELLEGREEN; LAWRENCE, 1957) conforme distribuição apresentada na figura 13. Em contrapartida, trinta e um por cento da amostra, apesar das leves alterações apresentadas ao exame de raios-X de joelho e, portanto classificadas como grau I, apresentavam diagnóstico clínico da doença segundo os critérios do *American College of Rheumatology* (ALTMAN *et al.*, 1986).

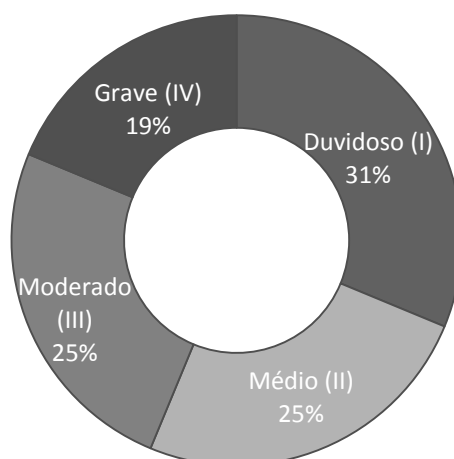


Figura 13. Classificação da osteoartrite de joelho por meio da análise do exame de raios-X e segundo os critérios estabelecidos por Kellgren e Lawrence_ Graus de I até IV (n= 16).

Ressalta-se que, como especificado no capítulo anterior, os dados foram analisados na perspectiva do efeito agudo do esforço físico (uma sessão de exercício) e efeito crônico da intervenção (terapia por exercício de 12 semanas, 36 sessões) e os resultados serão apresentados na perspectiva da interação entre eles e também dos efeitos específicos de cada um deles. Para o efeito agudo temos “esforço físico” e “repouso” e para o efeito crônico temos “terapia por exercício”, conforme organizado e descrito na tabela 5 para melhor entendimento dos resultados. O “esforço físico” refere-se à diferença entre o valor obtido imediatamente após o stress agudo e o valor inicial, de homeostase. Complementarmente, o efeito do descanso após o término do stress agudo, aqui denominada “repouso” refere-se à diferença entre o valor obtido após os trinta minutos de repouso em decúbito dorsal e o valor inicial.

A auto percepção das voluntárias para dor, rigidez articular e função física antes e após o programa de terapia por exercício de doze semanas mostrou redução nos três domínios como apresentado na figura 14. Houve uma redução na percepção da dor de 43% ($p= 0,011$), uma redução da rigidez articular de 53% ($p= 0,13$) e melhora da função física de 47% (0,001).

Tabela 5: Descritores dos efeitos da intervenção fisioterápica.

Efeito agudo	Efeito crônico (treinamento)
<p>Esforço físico</p> <p>Este termo representa o esforço durante “atividade motora. A intensidade do esforço pode ser medida pela taxa de consumo de oxigênio, calor produzido ou frequência cardíaca. O esforço percebido, uma medida psicológica do esforço, também é incluído”.</p> <p>O seu correspondente na língua inglesa é <i>physical exertion</i>.</p> <p>Portanto trata-se aqui do efeito de uma sessão de exercício, um teste máximo realizado em esteira motorizada. Refere-se à diferença entre os valores obtidos pelas variáveis analisadas imediatamente após este estresse agudo e o valor inicial, de homeostase.</p>	<p>Terapia por exercício</p> <p>Este termo representa um “regime ou plano de atividades físicas concebido e prescrito para alcançar objetivos terapêuticos específicos. Seu propósito é restaurar a função musculoesquelética normal ou reduzir dores causadas por doenças ou lesões”</p> <p>O seu correspondente na língua inglesa é <i>exercise therapy</i>.</p> <p>Portanto trata-se aqui de um conjunto de sessões de fisioterapia, especificamente 36 sessões ofertadas 3 vezes por semana em dias alternados.</p>
<p>Repouso (Repouso em Cama)</p> <p>Este termo representa o “confinamento de um indivíduo à cama, por razões terapêuticas ou experimentais.”.</p> <p>Portanto trata-se aqui do efeito da redução da velocidade de caminhada na esteira e do descanso após o término do stress agudo. Esta “recuperação” compreende a diferença entre o valor obtido após os trinta minutos de repouso em decúbito dorsal e o valor inicial.</p> <p>O seu correspondente na língua inglesa é <i>bed rest</i>.</p>	

Fonte: Estes termos foram definidos previamente segundo os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), criados pela BIREME e disponíveis na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) em <http://decs.bvs.br>.

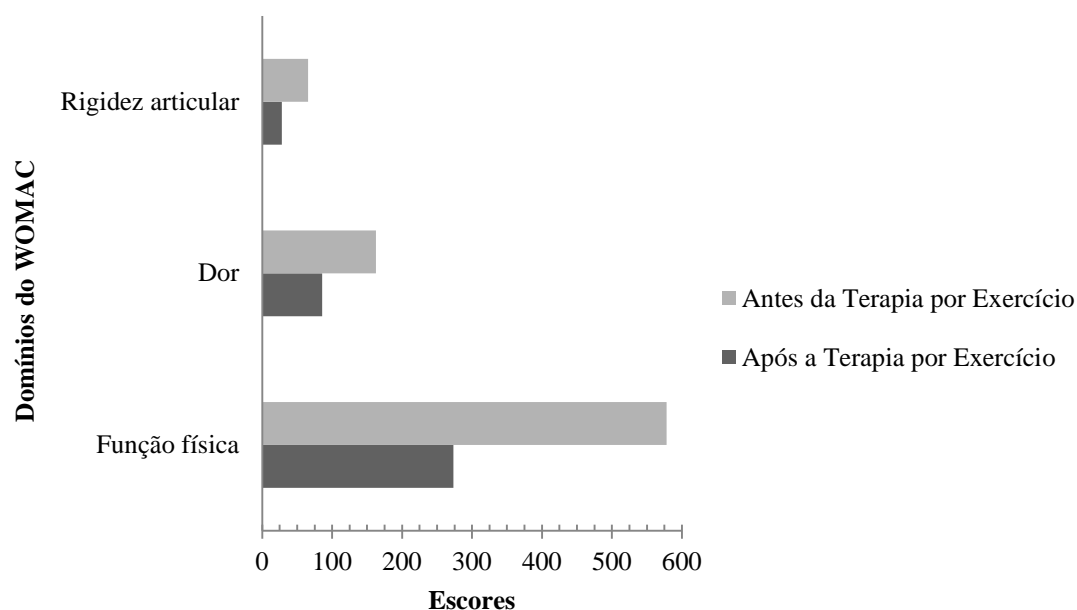


Figura 14: Domínios do questionário WOMAC, antes e após o programa de terapia por exercício respondido por idosas com osteoartrite de joelho (n=16). Teste estatístico utilizado teste t-Student. Nível de significância de 95%.

Para qualidade de vida, o programa de terapia por exercício promoveu melhora da qualidade de vida em todos os quatro domínios físicos do SF-36, capacidade funcional (score médio pós-treinamento $72,50 \pm 2,50$; $p < 0,01$), aspectos físicos (score médio pós-treinamento $85,94 \pm 3,20$; $p < 0,01$), dor corporal (score médio pós-treinamento $64,19 \pm 2,06$; $p < 0,01$), estado geral de saúde (score médio pós-treinamento $65,75 \pm 2,72$; $p < 0,01$). E também nos quatro domínios restantes: aspectos sociais (score médio pós-treinamento $74,22 \pm 4,63$; $p < 0,05$), aspectos emocionais (score médio pós-treinamento $87,49 \pm 6,72$; $p < 0,05$), saúde mental (score médio pós-treinamento $79,75 \pm 3,21$; $p < 0,05$) e vitalidade (score médio pós-treinamento $74,38 \pm 2,99$; $p < 0,01$). (Figura 15)

Os resultados para a distância caminhada (TC6M) e a percepção de dor (EVD) estão apresentados na figura 16. O volume do treinamento aeróbico proporcionado pela terapia por exercícios foi significativamente suficiente para aumentar a distância caminhada e reduzir a auto classificação de intensidade da dor pelas voluntárias do estudo.

O desempenho físico, determinado pelo consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) em ml/kg/ min) que foi estimado pelo teste de esforço máximo, apresentou uma melhora de 21% com o programa de terapia por exercícios (média antes: 27,7 ml/kg/ min \pm 5, média após 33,6 ml/kg/ min \pm 5 e $p < 0.0001$).

Os níveis plasmáticos de sTNFR1 e sTNFR2 são mostrados na Figura 17. A análise do efeito do exercício agudo nas concentrações plasmáticas de sTNFR1 demonstrou que antes da terapia pro exercício houve um aumento imediatamente após o exercício agudo (Figura 17A_a) que se manteve depois de 30 minutos (Figura 17A_b) na fase de recuperação comparado ao repouso. Após a terapia por exercício observou-se que não houve modificação nas concentrações plasmáticas de sTNFR1 imediatamente após o exercício agudo seguido de redução após 30 minutos (Figura 17A_c) na fase de recuperação comparado com o repouso.

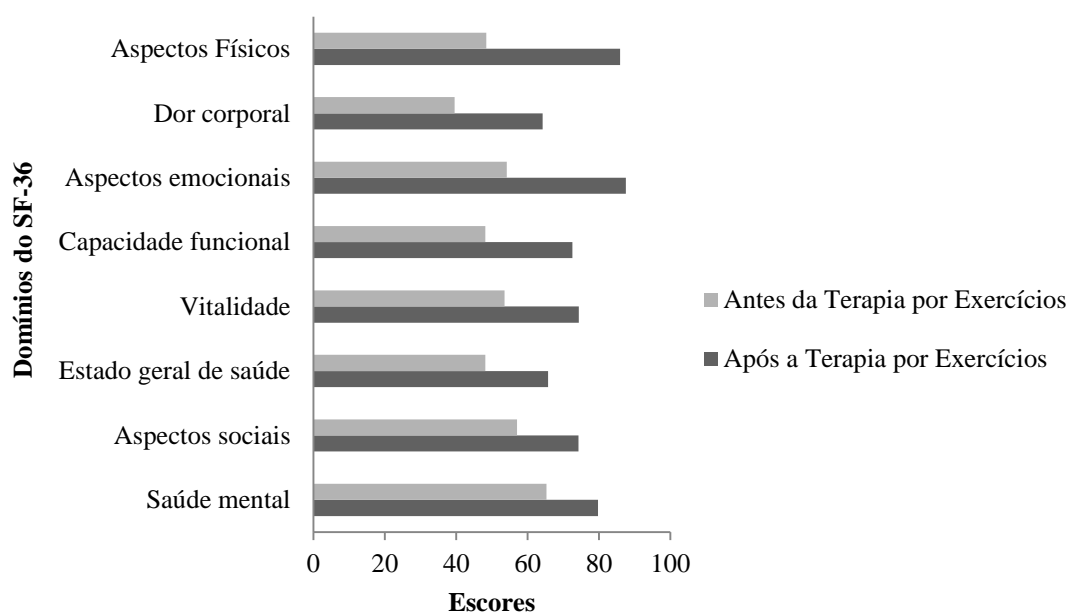
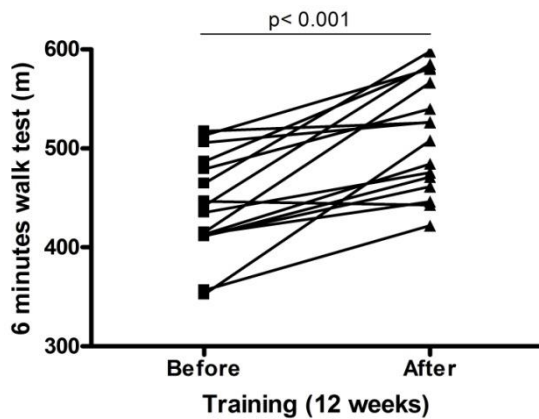


Figura 15 . Qualidade de Vida_ Escores da percepção de qualidade de vida avaliada pelo questionário *Short Form Health Survey (SF-36)*, antes e após o programa de terapia por exercício. Em cada domínio o escore varia de 0 até 100. Teste T Student.

Para as concentrações plasmáticas de sTNFR2, antes do treinamento, houve uma redução imediatamente após o exercício agudo (Figura 17B_a) que se manteve após 30 minutos (Figura 17B_b) na fase de recuperação comparado com o repouso. Depois do treinamento observou-se também que não houve modificação nas concentrações

plasmáticas de sTNFR2 imediatamente após o exercício agudo seguido de redução após 30 minutos (Figura 17B_d) na fase de recuperação comparado com o repouso.

a)



b)

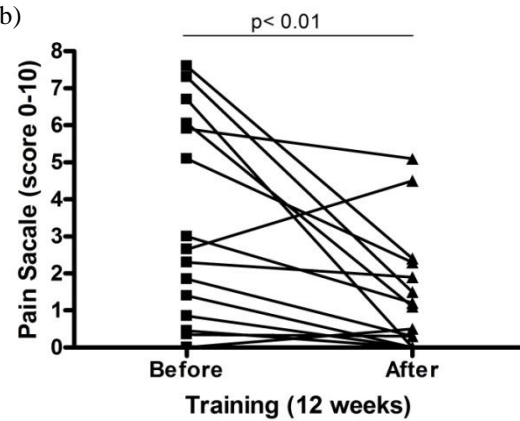
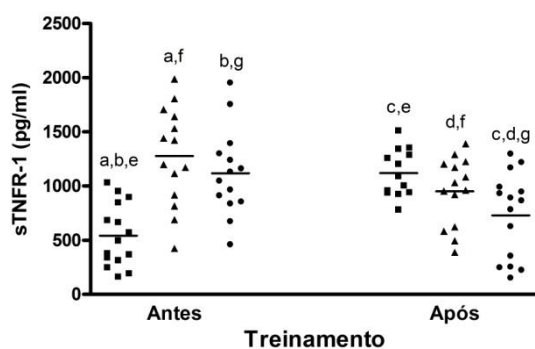


Figura 16: Valores das variáveis (a) funcional “teste de caminhada de seis minutos” (TC6M) e (b) clínica “escala visual de dor” (EVD)” antes e após a terapia por exercícios de 12 semanas. A análise estatística: t Student.

(A)



(B)

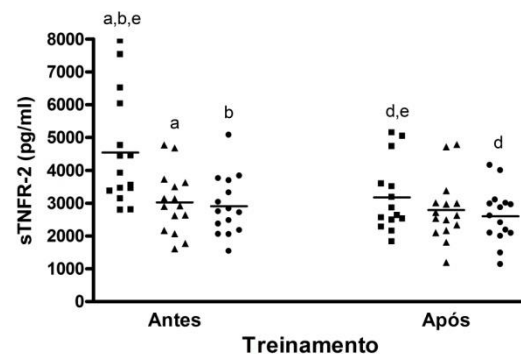


Figura 17: Concentrações plasmáticas de sTNFR1 (a) e sTNFR2 (b) de idosas com OA de joelho (n=15) antes e após o treinamento de 12 semanas, nos momentos pré-exercício agudo (■), pós-exercício agudo (▲) e pós trinta minutos de recuperação (●). As linhas horizontais (em negrito) indicam os valores médios. As letras superiores indicam as diferenças estatísticas encontradas, sendo que a, b, e significam $p < 0.001$; c, g significam $p < 0.01$; d, f significam $p < 0.05$. A análise estatística realizada foi com ANOVA 2x3.

Para o sTNFR1 todas as situações no momento antes do treinamento (pré-exercício agudo, pós-exercício agudo e 30 minutos de recuperação) foram estatisticamente diferentes das suas respectivas situações após o treinamento (Figura 17A_e,f,g). Já para o sTNFR2, somente a situação pré-exercício agudo foi diferente entre os momentos antes e após o treinamento (Figura 17B_e), com uma redução da concentração plasmática com o treinamento. Destaca-se que a terapia por exercício aumentou as concentrações plasmáticas de sTNFR1 (Figura 17A_e) e reduziu as concentrações plasmáticas de sTNFR2 (Figura 17B_e) quando comparamos as situações de antes do exercício agudo.

Não houve alteração significativa nas concentrações plasmáticas de IL-6 e TNF α , tanto no exercício agudo quanto no treinamento (exercício crônico), para as voluntárias com OA de joelho (tabela 6).

Table 6. Concentrações plasmáticas de citocinas e receptores solúveis de idosos comunitárias com OAj antes e após a terapia por exercício

		IC 95%			
	Média	Min	Max	DP	p
Antes					
IL-6	1.7	0.2	10.4	0.8	
TNF	37.8	0.0	265.0	20.1	
sTNFR1	540.7	159.4	1028.7	74.6	
sTNFR2	4542.8	2790.7	7947.5	435.9	
Após					
IL-6	1.2	0.1	2.9	0.2	> 0.05
TNF	72.0	0.0	386.7	29.1	> 0.05
sTNFR1	1120.0	778.7	1509.7	55.0	< 0.001
sTNFR2	3177.5	1828.0	5145.6	271.0	< 0.001

Min: mínimo, Max: máximo, DP: desvio padrão, p: valor p, IC: intervalo de confiança,

Antes: antes da terapia por exercício; Após: após a terapia por exercício.

A figura 18 mostra a análise de correlação entre o efeito do treinamento (valor da variação entre os momentos pós e pré treinamento) nas concentrações plasmáticas de sTNFR1 e auto-percepção de função física (a) e teste de caminhada de seis minutos (b). Ganhos nas concentrações plasmáticas de sTNFR1 com o treinamento estão associados

às reduções nos escores do questionário WOMAC para o domínio função física ($r = -0.519$; $p=0.034$) e aos aumentos na distância percorrida durante o TC6M ($r = 0.628$; $p=0.010$), ambos representando melhora clínico-funcional das pacientes.

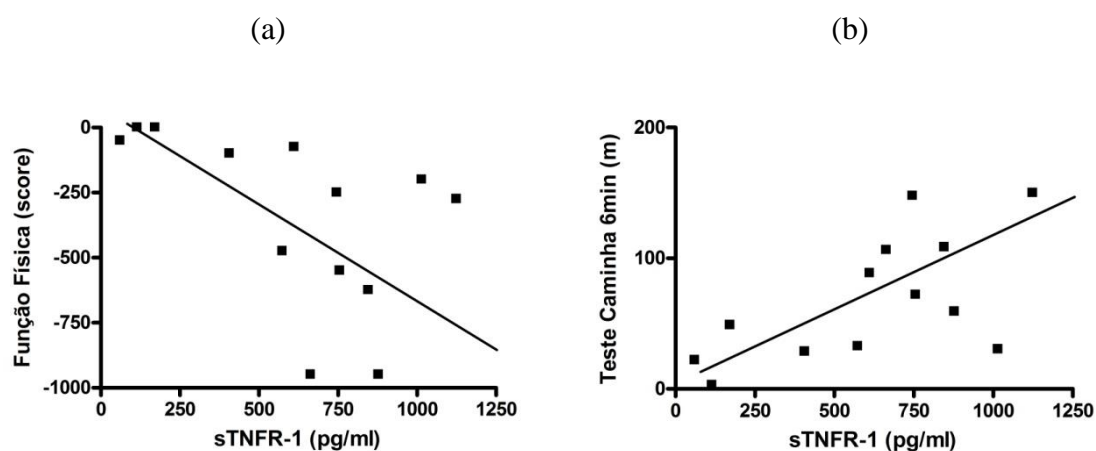


Figura 18: Correlação entre o efeito do treinamento nas concentrações plasmáticas (delta) de sTNFR1 (a,b) de idosas com OA de joelho e os escores (delta) de Função Física do questionário WOMAC (a) e a distância percorrida (delta) no teste de caminhada de seis minutos (b). A análise estatística realizada foi correlação de Pearson.

Em adição encontramos correlação entre as mudanças nas concentrações plasmáticas de TNF- α e nos escores do questionário WOMAC para o domínio função física ($r = 0.501$; $p=0.034$). Esta correlação direta significa piora funcional associada às concentrações plasmáticas mais elevadas desta citocina.

Os resultados das concentrações de BDNF estão apresentados na figura 19, em pg/ml. O esforço físico aumentou as concentrações de BDNF imediatamente após a intervenção, elevando de 7693 pg/ml (± 4454) para 12.242pg/ml (± 3.806), com $p < 0.001$. Elevados níveis de BDNF (11.190pg/m ± 3.8470) persistiram após 30 minutos de recuperação se comparados aos níveis pré-teste, com $p < 0.001$. Na situação das voluntárias treinadas, pós terapia por exercício, nós não detectamos mudanças nas concentrações de BDNF com o esforço físico.

A terapia por exercício aumentou as concentrações basais de BDNF quando comparamos as voluntárias com OAj antes do treinamento com a situação treinadas

(antes: $8343 \text{ pg/ml} \pm 3690$ e após $14027 \text{ pg/ml} \pm 4361$, $p < 0.001$), como demonstrado na figura 20.

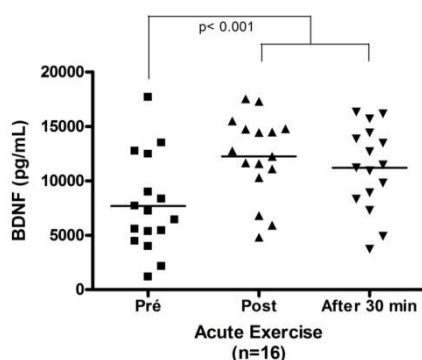


Figure 19: Concentrações plasmáticas de BDNF de idosas comunitárias com OAj ($n=16$) antes do treinamento, nas situações Pré (antes do esforço físico), Pós (depois do esforço físico) e 30 (trinta minutos) após o esforço físico. As linhas horizontais indicam os valores médios de cada momento. A análise estatística realizada foi ANOVA para medidas repetidas e *post hoc* de Bonferroni.

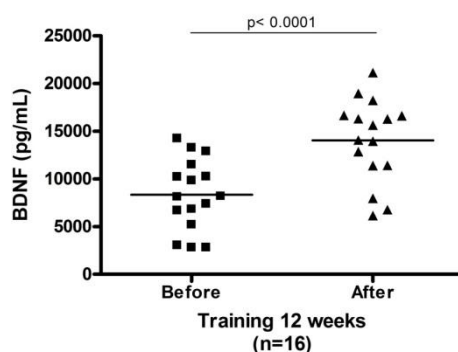


Figura 20: Concentrações plasmáticas de BDNF de idosas com OAj ($n=16$) antes e após a terapia por exercícios de 12 semanas. A análise estatística: t Student.

A tabela 7 apresenta o comportamento das principais populações de leucócitos diante da terapia por exercício, tendo como resultado a redução das porcentagens de neutrófilos e linfócitos circulantes.

Tabela 7. Contagem de células do plasma de idosas com OAj antes e após 12 semanas de caminhada (3x/semanas).

	Antes				Após				p
	Média	95% IC		DP	Média	95% IC		DP	
		Min	Max			Min	Max		
Leucócitos (cells/mm ³)	7948	6056	6859	3539	6025	5257	6793	1441	0.06
Linfócitos (%)	39	32	45	12	37	31	43	11	0.01*
Monócitos (%)	04	03	05	01	03	01	04	03	0.27
Neutrófilos (%)	53	47	60	12	56	51	61	08	0.03*

*p<0.05; Min: mínimo, Max: máximo, DP: desvio padrão, IC: intervalo de confiança, Antes: antes da terapia por exercício; Após: após a terapia por exercício.

Os dados (figura 21) demonstram que a terapia por exercício (12 semanas, 3x/semana) não modificou a porcentagem de CD8⁺, média antes 26,1 ±8 e média após 24,5 ±10 e p= 0,1604 (figura 21A) ou de CD8⁺CD28⁺, média antes 11,3 ±3 e média após 10,43 ±3 e p= 0,1227 (figura 21B). Contudo a intensidade média de fluorescência (CD8⁺CD18⁺) apresentou-se aumentada com a intervenção: média antes 64,2 ±27; média após 85,02 ±35 e p= 0,0130 (figura 21C).

Diferentemente dos resultados de CD8⁺, nós observamos uma redução na porcentagem de células CD4⁺ com o treinamento (figura 21D): média antes 46,59 ± 7, média após 44,58 ± 9 e p = 0, 0189. Contudo, similarmente aos resultados de CD8⁺, a porcentagem de células ativadas (CD4⁺CD28⁺) não mudou com a intervenção (figura 21E): média antes 40,42 ± 9, média após 37,90 ± 11 e p= 0,0505 e houve um aumento da intensidade de fluorescência de CD4⁺CD18⁺ (figura 21F): média antes 45,30 ± 10, média após 64,27 ± 33 e p= 0,0256.

Como sugerido por Halland (HAALAND *et al.*, 2008) nós analisamos a interação entre uma sessão e as trinta e seis sessões de exercícios ou, em outras palavras, analisamos a influência entre o exercício agudo (esforço físico) e o exercício crônico (terapia por exercício) com a ANOVA bifatorial e não encontramos interação entre as dois (F= 2,747 e p= 0,0695).

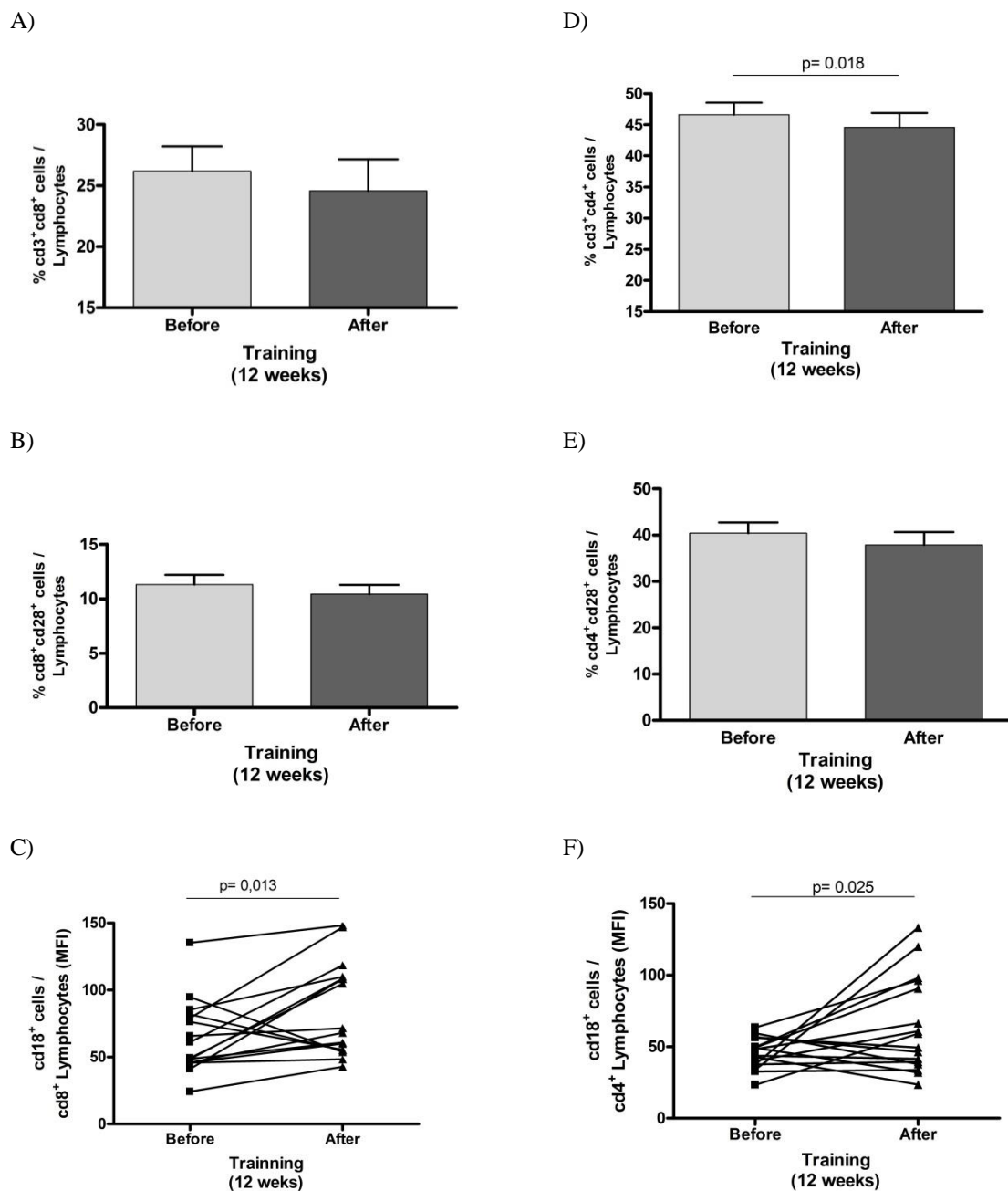


Figura 21. Análise fenotípica dos leucócitos circulantes no sangue periférico de idosas comunitárias com OAj. Percentual de subpopulação de células $TCD8^+$ (A) e células $TCD4^+$ (D) e o estado de ativação das células $CD8^+$ e $CD4^+$ por marcação conjunta de $CD28$ (B e E respectivamente). A análise da expressão da integrina $CD18$ na superfície celular antes e após a terapia por exercício está apresentada em C (linfócitos $TCD8^+$) e F (linfócitos $TCD4^+$). A análise estatística: t Student.

5. DISCUSSÃO

Um dos maiores destaques desta teste é o fato de avaliar condições imunes específicas de idosos com osteoartrite de joelho associando o efeito da terapia por exercícios (um programa clássico de tratamento fisioterápico) à uma sessão de exercício (esforço físico) exercício agudo. A terapia por exercícios de 12 semanas elevou a concentração plasmática de sTNFR1 e reduziu sTNFR2. Paralelamente e similarmente, uma sessão de 20 minutos de exercício na esteira, anteriormente ao início das sessões regulares, também elevou os níveis de sTNFR1 e também reduziu sTNFR2 e estas alterações foram mantidas 30 minutos após o término da atividade. Além disso, com as intervenções, não detectamos alterações nas concentrações plasmáticas de TNF α e IL-6. Além disso, foi observado aumento da expressão de CD18, uma integrina expressa em linfócitos T ativados, nas células circulantes das voluntárias, o que poderia sugerir um potencial migratório aumentado das subpopulações de linfócitos T em direção ao foco da lesão inflamatória, o joelho.

Mesmo que nossos achados não vão ao encontro a estudos anteriores que não observaram alterações dos receptores solúveis com o treinamento (BRUUNSGAARD *et al.*, 2004) ou que relatam correlação negativa entre os níveis de sTNFR1 e as condições funcionais e escores de dor (PENNINX; ABBAS, 2004), eles estão de acordo com o conceito básico do papel modulador direto deste receptor solúvel sobre a ação do TNF α . Especificamente, sua presença em altas concentrações plasmáticas poderia indicar um processo inflamatório ativo, mas não o sTNFR1 como causa e sim na tentativa de controle inativando o TNF α (MARTELPelletier, 2004; PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

Nós optamos por analisar em nosso estudo os receptores solúveis de citocinas por estarem descritos como mais estáveis na circulação e com isso melhores marcadores da inflamação crônica (PENNINX; ABBAS, 2004). Nossos achados mostraram comportamentos antagônicos de sTNFR1 e STNFr2 diante do treinamento, já no estudo de Penninx (PENNINX; ABBAS, 2004), que avaliou a correlação entre citocinas e receptores solúveis, a maior correlação encontrada (Spearman $r=0,81$) foi uma correlação direta entre sTNFR1 e sTNFR2. Além disso, estes receptores foram associados a IL-6 e TNF α .

Já Bruunsgaard e colaboradores (BRUUNSGAARD *et al.*, 2004) em 2004 não verificaram alteração do sTNFR1 com o exercício crônico, mas descreve uma

correlação inversa entre os níveis plasmáticos deste receptor antes do treinamento com a força muscular dos flexores e extensores de joelho após o treinamento de resistência de 12 semanas. Justificam, no estudo, que altos níveis de sTNFR1 representariam um processo inflamatório de baixo grau, presente em idosos nonagenários, que influenciariam negativamente a capacidade de treinamento destes indivíduos.

Em um estudo mais recente, Coelho e colaboradores (COELHO, FERNANDA MATOS *et al.*, 2010) encontraram concentrações plasmáticas de sTNFR1 mais elevadas em idosos institucionalizados quando comparados àqueles que viviam na comunidade, mas em ambos estas concentrações plasmáticas se correlacionaram com a idade dos voluntários. Interessante destacar que os idosos de nosso estudo também viviam na comunidade, porém tinham OA de joelho, o que poderia justificar concentrações plasmáticas mais elevadas de sTNFR1 antes do treinamento, refletindo um processo inflamatório de baixo grau. Porém após o treinamento a média da concentração plasmática de sTNFR1 foi ainda maior, o que não poderia ser justificado pelo aumento do processo inflamatório. E o comportamento diante o exercício agudo foi oposto antes e após o treinamento, o que poderia ser influenciado por patamares distintos de concentrações de sTNFR1.

Diferentemente de sTNFR1, o sTNFR2 reduziu sua concentração plasmática com o treinamento crônico e também mostrou concentrações plasmáticas menores após o exercício agudo. Opal e colaboradores (OPAL, 2000) destacam o papel de agonista do sTNFR2 em relação ao TNF α , que ao ligar-se a esta citocina prolonga sua vida útil e com isso sua ação pró-inflamatória.

Parece que a ação agonista ou antagonista dos receptores solúveis está relacionada à sua concentração local ou sistêmica. As concentrações plasmáticas de sTNFR2 são naturalmente maiores nos pacientes com OA (OTTERNESS *et al.*, 2000) e o exercício poderia modular este fenômeno (PETERSEN; PEDERSEN, 2005), promovendo maior proteção articular.

O TNF- α é uma citocina inflamatória que parece desempenhar um papel importante no início e na progressão da destruição da cartilagem articular (PENNINX; ABBAS, 2004). Nosso estudo não ter detectado alteração nas concentrações plasmáticas de TNF α , apesar do seu papel fulcral no processo inflamatório de baixo grau, pode estar relacionado ao caráter menos estável desta citocina, que varia com o período do dia e também tem uma meia-vida pequena (PENNINX; ABBAS, 2004). A produção de

TNF α pelo músculo após o exercício parece repercutir somente neste tecido e a detecção sistêmica é pouco provável (BRUUNSGAARD *et al.*, 2004). Além disso, o volume de treinamento instituído às idosas pode não ter sido suficiente para desencadear eventos detectáveis de TNF- α . Em outro estudo de 12 semanas de intervenção, porém com treinamento de resistências muscular, os autores também não detectaram alterações de TNF- α (BRUUNSGAARD *et al.*, 2004). Kohut e colaboradores, em 2006, verificaram redução do TNF- α com o exercício aeróbico crônico (KOHUT *et al.*, 2006). Vale lembrar que mesmo sem alterações significativas de concentrações plasmáticas com os exercícios propostos, TNF- α correlacionou-se negativamente com a função física em nossos achados.

Já o papel da IL-6 na osteoartrite e no exercício físico é mais controverso. Nosso estudo não detectou alterações nas concentrações plasmáticas de IL-6, assim como o estudo de Bruunsgaard (BRUUNSGAARD *et al.*, 2004) em que um treino de resistência muscular com idosos também não surtiu mudanças. Em contra partida, níveis plasmáticos elevados desta citocina tem sido considerados indicadores de sarcopenia, perda de massa muscular e função física, além de um fator agravante na progressão da osteoartrite de joelho (FERRUCCI *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2011). Em um estudo com 80 idosos com OA, Santos e colaboradores não encontraram correlação entre IL-6 e funcionalidade, mas sim com a resistência dos músculos flexores de joelhos (correlação inversa) (SANTOS *et al.*, 2011). Nossos idosos tinham níveis plasmáticos iniciais de IL-6 altos (6.31 pg/mL), mas não apresentavam correlação com funcionalidade, mesmo que pontos de corte sejam relatados por volta de 3 pg/mL.

No contexto da inconsistência do papel da IL-6, uma vertente de pesquisadores afirma que esta citocina tem um papel pró-inflamatório (FONSECA *et al.*, 2009) enquanto outra que se trata de uma citocina anti-inflamatória (OPAL, 2000), o que parece levar à conclusão de se tratar de um modulador da inflamação. Opal e seus colaboradores descreveram que a IL-6 regula negativamente a síntese de IL-1 e TNF α , além de promover a síntese de sTNFR1 (OPAL, 2000). Fato é que a IL-6 tem papel importante nas artropatias inflamatórias, estando presente no líquido sinovial, mas seu real papel ainda é fonte de estudos e controvérsias (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

Apesar das restrições para inferências de causa e efeito nos casos das análises de correlações entre variáveis, nossos achados reforçam os resultados dos efeitos das intervenções, já que os aumentos de sTNFR1 foram associados à melhora da distância

caminhada e da função física. Contudo estas associações também são controversas na literatura. Penninx e colaboradores (PENNINX; ABBAS, 2004) encontraram correlação inversa, onde níveis plasmáticos altos foram associados à menor capacidade funcional. Diferentemente do nosso desenho experimental, essa pesquisa foi um estudo transversal, com uma única coleta sanguínea. Como nosso experimento constou de um programa de terapia por exercícios de doze semanas, isso permitiu observarmos que o comportamento de sTNFR1 ao exercício agudo (esforço físico) foi diferente antes e após o treinamento. Nos indivíduos sedentários a caminhada na esteira elevou as concentrações plasmáticas de sTNFR1 e depois de 12 semanas de treinamento, o mesmo exercício reduziu as essas concentrações. Nossa hipótese, neste caso é que com o treinamento estes indivíduos conquistaram níveis mais adequados de sTNFR1, como uma função moduladora anti-inflamatória prévia. As concentrações plasmáticas de sTNFR2 não apresentaram correlação com os domínios do WOMAC nem com o TC6M.

Nossos resultados mostraram que o exercício crônico aumentou os concentrações plasmáticas sTNFR1 e estas concentrações correlacionam-se com a melhora funcional, porém o comportamento deste receptor solúvel diante ao exercício agudo depende das concentrações iniciais. As concentrações plasmáticas de sTNFR2 reduzem com o treinamento e com o exercício agudo. Esses achados possivelmente indicam que para a população estudada os comportamentos de sTNFR1 e sTNFR2 não são os mesmos e estes receptores podem ter papéis moduladores distintos na inflamação osteoartrítica, dependendo da concentração plasmática, do nível de sedentarismo do indivíduo e do tipo de exercício ao qual é exposto.

Resumidamente os achados referentes ao BDNF foram: 1) exercício agudo (uma sessão de esforço físico na esteira): aumentou as concentrações plasmáticas que se mantiveram após 30 minutos de repouso e assim podemos supor que ocorreu alteração da homeostase inicial. 2) o exercício crônico (36 sessões de terapia por exercício): aumentou os níveis basais deste fator neurotrófico, o que pode nos levar a supor uma mudança do patamar basal das idosas de nossa amostra (homeostase).

Em humanos, a resposta do BDNF ao exercício depende do tipo de da intensidade do exercício. Em sua revisão de 2010, Kristel Knaepen afirma que independentemente da intensidade do exercício, as concentrações de BDNF retornam aos valores basais com 15 a 60 minutos de repouso e podem atingir valores inferiores

aos basais após este tempo (KNAEPEN *et al.*, 2010). Outros estudos tem demonstrado mudanças nas concentrações circulantes de BDNF em indivíduos saudáveis durante a realização de diferentes tipos e intensidades de exercícios (CORREIA; SCORZA; SILVA, 2011).

Os níveis pós-exercício de concentração de BDNF pode ser inversamente correlacionados ao desempenho cardiorrespiratório, para a população jovem. Um estudo brasileiro demonstrou que aumentos das concentrações de BDNF em corredores foram relacionados ao desempenho nas provas (CORREIA; SCORZA; SILVA, 2011). Em um recente estudo com idosos, com diferentes fenótipos da síndrome de fragilidade, Coelho e colaboradores mostraram que a fragilidade está associada a uma redução e que exercícios fisioterápicos são capazes de modificar a liberação sistêmica deste marcador (COELHO, F M *et al.*, 2011).

Baixos níveis plasmáticos de BDNF podem estar associados ao envelhecimento e também a diversas doenças, em contrapartida os exercícios podem aumentar as concentrações de BDNF mediando positivamente o envelhecimento saudável. Esta hipótese ganha força gradativa com o avanço científico na área e é suportado também pelo presente estudo, especificamente com a população de idosos com OAj.

Além dos componentes solúveis, tem sido sugerido que o curso clínico da osteoartrite de joelho é influenciado por mecanismos relacionados com a função efetora dos linfócitos T (HASEEB; HAQQI, 2013).

Os linfócitos T são subclassificados em linfócitos T CD4 e CD8 e esses, frente a fatores diversos tais como o microambiente com estímulos diversos provenientes da presença de fatores solúveis e de membrana, podem direcionar a resposta imune para mecanismos ligados a resolução ou manutenção da resposta inflamatória (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Diante dessa complexa rede de interações entre células e estímulos, os linfócitos T respondem de maneira diversa e até antagônica. Os linfócitos T, por exemplo, podem participar intensificando a resposta inflamatória, como ocorre com os linfócitos Th1 ($CD3^+CD4^+TNF^+$), Th17 ($CD3^+CD4^+IL-17^+$) e T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$), mas podem regular e controlar a resposta inflamatória, como é o caso dos linfócitos Treg ($CD3^+CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$) e T supressores ($CD3^+CD8^+$). Os mecanismos de como e

quando essas populações agem de maneira distinta ainda é alvo de diversas investigações. (BAYLIS *et al.*, 2013)

Estudos clínicos realizados ao longo do tempo tem mostrado que o sistema imune responde ao aumento da atividade física. Os efeitos do exercício intenso sobre a resposta imunológica diferem daqueles observados durante o exercício de intensidade moderada (ZHAO *et al.*, 2012), onde os indivíduos que mantem exercícios frequentes de alta intensidade parece ser mais imunocomprometidos que aqueles que realizam exercício de atividade física moderada. Neste contexto, tem sido proposto que a intensidade do exercício físico tem influência sobre as subpopulações dos linfócitos Th17 e Treg. Os linfócitos Th17 são linfócitos T $CD4^+$ que produzem interleucina IL17, uma citocina que desempenha um papel crucial em processos alérgicos, inflamatórios e é conhecida como uma poderosa célula pró-inflamatória em doenças autoimunes crônico-degenerativas(WALSH, NEIL P *et al.*, 2011). Já os linfócitos T $CD4^+CD25^+$ reguladores, são linfócitos T diferenciados e ativamente envolvidos no controle da resposta imune periférica. As células Treg são originadas de linfócitos precursores $TCD4^+CD25^-$, que após estimulação com TGF- β e IL-2, sinalizam a expressão de FOXP3 que mantém a função reguladora das células Treg. [13,14]. Estudos recentes tem ainda relatado a participação de linfócitos T CD8 ($CD3^+CD8^+CD45^{RC^{low}}$) em mecanismos imunossupressores, principalmente na regulação de resposta inflamatória aguda em transplantes halogênicos. No entanto, os mecanismos reguladores dessa população de celular ainda permanecem desconhecidos (SAKAGUCHI *et al.*, 2009).

O presente estudo demonstrou que o exercício físico em pacientes idosas com osteoartrite de joelho promoveu uma melhora significativa na qualidade de vida e funcional das pacientes. A análise antes e pós treinamento revelou uma diminuição de linfócitos do sangue periférico. A análise da expressão do marcador de migração celular CD18 revelou um aumento nas subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$. O CD18 é uma integrina expressa em linfócitos T ativados de maneira antígeno-específica, e substituem os receptores de selectinas constitutivamente encontrados em células virgens restritas aos órgãos linfoides secundários. Dessa forma, o aumento da expressão dessa molécula poderia sugerir um potencial migratório aumentado das subpopulações de linfócitos T em direção ao foco da lesão inflamatória, principalmente dos linfócitos T $CD4^+$, como observado pela queda percentual de linfócitos $TCD4^+$ no sangue periférico dos pacientes avaliados.

Isso nos levou a seguinte hipótese: o exercício físico de intensidade moderada aqui apresentado poderia ter proporcionado uma imunossupressão caracterizada pela migração direcionada de linfócitos Treg (CD4+) e isso foi capaz de influenciar o status imune das idosas e de proporcionar o controle da inflação local e consequentemente na melhora clínica.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando pesquisamos a osteoartrite nas principais bases de dados bibliográficos mundiais observamos que se trata de uma doença bastante estudada. Contudo além de termos uma distância enorme entre os resultados destas pesquisas e a realidade da prática clínica, muitas repostas básicas ainda não estão claramente esclarecidas. Como é o exemplo da ampla elucidação do efeito de um recurso da fisioterapia, que é o treino de marcha em esteira ou no solo, em pacientes com osteoartrite de joelho, principalmente no que tange aos aspectos celulares e moleculares envolvidos.

Esta tese, desenvolvida sob a orientação do professor Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo e co-orientação das professoras Dra. Vanessa Amaral Mendonça e Dra. Ana Cristina Rodrigues Lacerda, vai ao encontro à lacuna citada ao tentar dar mais um passo no caminho da elucidação dos efeitos anti-inflamatórios da caminhada (prescrita por profissional baseada em parâmetros avaliativos individuais, progressivos e controlados na sua execução) em uma amostra de idosas da comunidade com diagnóstico de osteoartrite de joelho.

É consenso científico que os exercícios físicos de intensidade moderada têm efeitos positivos no desempenho funcional e nos aspectos clínicos de pacientes com osteoartrite de joelho. Por outro lado muitos profissionais de saúde ainda contraindicam a caminhada para este grupo de pacientes receosos em aumentar o processo inflamatório na articulação do joelho com esta atividade.

Em nosso estudo quase-experimental, a terapia por exercício de caminhada, três vezes por semana, durante doze semanas, com intensidade entre 70 e 80% da frequência cardíaca máxima promoveu mudanças biológicas, no mínimo instigantes, ao não aumentar as concentrações plasmáticas de citocinas pro inflamatórias (IL-6 e TNF α), ao promover maior produção de um fator neuroprotetor (BDNF) e ainda ao tornar células do sistema imune (linfócitos T) mais ativadas e possivelmente com maior potencial migratório para o foco da lesão.

Vale lembrar aqui que nossas voluntárias vivem na comunidade (cidade de Diamantina-MG) e não apresentaram comprometimento cognitivo, sinais e sintomas depressivos e são moderadamente ativas. As influências culturais locais e o próprio relevo acidentado da região, além dos aspectos alimentares podem ter interferido nos resultados.

Deve-se destacar, é claro, que podemos estar diante de uma para-fenômeno e que outros desenhos experimentais devem parte do escopo desta linha de estudo. Parece claro que a ação silenciosa dos mediadores inflamatórios deve ser foco de aprofundamento das pesquisas já que estas apontam para o efeito direto nos fenótipos dos idosos (Síndrome da fragilidade, Inflammaging), nas condições de órgãos e sistemas (Sarcopenia) e consequentemente na capacidade funcional para as tarefas cotidianas e na qualidade de vida destas pessoas.

O presente estudo apresenta como limitação a ausência de grupo controle (desenho quase-experimental) o que limita a generalização dos resultados. Além disso, por se tratar de uma amostra de conveniência, a ocorrência de um possível viés de seleção pode ter ocorrido. Outros limitantes devem ser observados para os próximos estudos: realizar um maior controle da composição corporal da amostra (relação cintura-quadril, exame de imagem), realizar avaliação específica para detecção e classificação depressão, realizar acompanhamento dos efeitos dose-dependentes da caminhada na osteoartrite de joelho.

Enfim, fenômenos associados ao tratamento fisioterápico podem ditar caminhos para novas pesquisas relacionadas à prática de exercícios por indivíduos com doenças inflamatórias. Ao dar padrões seguros de prescrição de exercício, esta tese contribui também clara, direta e imediatamente no cotidiano dos profissionais de saúde que tratam de idosos com osteoartrite de joelho. Especialmente para a prática clínica da Fisioterapia, considerando que pode auxiliar na fundamentação da prescrição da caminhada como exercício terapêutico para idosos com osteoartrite de joelho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A; LICHTMAN, A. *Imunologia Celular e Molecular*. 5. ed. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2005.
- ALTMAN, R *et al.* Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis and Rheumatism*1, v. 29, n. 8, p. 1039–1049, 1986.
- AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. *ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription*. 6. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 368
- ARDEN, Nigel; NEVITT, Michael C. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, v. 20, n. 1, p. 3–25, fev. 2006.
- BALKE, B. A simple field test for the assessment of physical fitness. *Civil Aeromedical Research Institute (U.S.)*, p. 1–8, abr. 1963.
- BAYLIS, Daniel *et al.* Understanding how we age: insights into inflammaging. *Longevity & healthspan*, v. 2, n. 1, p. 8, jan. 2013.
- BELLAMY, N *et al.* Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *The Journal of Rheumatology*, v. 15, n. 12, p. 1833–40, dez. 1988.
- BENNELL, Kim; DOBSON, Fiona; HINMAN, Rana. Measures of physical performance assessments: Self-Paced Walk Test (SPWT), Stair Climb Test (SCT), Six-Minute Walk Test (6MWT), Chair Stand Test (CST), Timed Up & Go (TUG), Sock Test, Lift and Carry Test (LCT), and Car Task. *Arthritis care & research*, v. 63 Suppl 1, n. November, p. S350–70, nov. 2011.
- BERTOLUCCI, Paulo H F *et al.* O mini-exame de estado mental em uma população geral: impacto da escolaridade. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 52, n. 1, p. 1–7, 1994.
- BIJLSMA, Johannes W J; BERENBAUM, Francis; LAFEBER, Floris P J G. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*, v. 377, n. 9783, p. 2115–26, 18 jun. 2011.
- BINDER, Devin K. The role of BDNF in epilepsy and other diseases of the mature nervous system. In: SCHARFMAN, DEVIN K. BINDER; HELEN E. (Org.). *Recent Advances in Epilepsy Research*. [S.l.]: Plenum, 2004. v. 548. p. 34–56.
- BONNET, C S; WALSH, D a. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford, England)*, v. 44, n. 1, p. 7–16, jan. 2005.
- BORG, GA. Psychophysical bases of perceived exertion. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v. 14, n. 5, p. 377–381, 1982.
- BRASIL, Ministério da Saúde. *Estatuto do Idoso*. 2ª. ed. Brasília: Editora MS, 2007. p. 70
- BROWN, Frankie F *et al.* Training status and sex influence on senescent T-lymphocyte redistribution in response to acute maximal exercise. *Brain, behavior, and immunity*, 4 nov. 2013.

BRUCKI, SMD; NITRINI, Ricardo; CARAMELLI, Paulo. Sugestões para o uso do mini-exame do estado mental no Brasil. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 61, n. 3B, p. 777–781, 2003.

BRUUNSGAARD, Helle *et al.* Muscle strength after resistance training is inversely correlated with baseline levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the oldest old. *Journal of the American Geriatrics Society*, v. 52, n. 2, p. 237–241, 2004.

CALDAS, Célia Pereira. Envelhecimento com dependência : responsabilidades e demandas da família. *Caderno de Saúde Pública*, v. 19, n. 3, p. 773–781, 2003.

CHEN, MJ; FAN, Xitao; MOE, ST. Criterion-related validity of the Borg ratings of perceived exertion scale in healthy individuals: a meta-analysis. *Journal of Sports Sciences*, v. 20, p. 873–899, 2002.

CHODZKO-ZAJKO, Wojtek J *et al.* American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults. *Medicine and science in sports and exercise*, v. 41, n. 7, p. 1510–30, jul. 2009.

CLARK, Brian C; MANINI, Todd M. Sarcopenia dynapenia. *Journal of Gerontology*, v. 63, n. 8, p. 829–34, ago. 2008.

CLARK, Brian C; MANINI, Todd M. What is dynapenia? *Nutrition*, v. 28, n. 5, p. 495–503, maio 2012.

CLOSS, Vera Elizabeth; SCHWANKE, Carla Helana Augustin. Aging index development in Brazil , regions , and federative units from 1970 to 2010. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, v. 15, n. 3, p. 443–458, 2012.

COELHO, F M *et al.* Physical therapy intervention (PTI) increases plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in non-frail and pre-frail elderly women. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, v. 54, n. 3, p. 415–20, 2011.

COELHO, Fernanda Matos *et al.* sTNFR-1 is an early inflammatory marker in community versus institutionalized elderly women. *Inflammation Research*, v. 59, n. 2, p. 129–34, fev. 2010.

COLLAZIOL, Diego *et al.* Psychoneuroendocrine correlates of lymphocyte subsets during healthy ageing. *Mechanisms of ageing and development*, v. 125, n. 3, p. 219–27, mar. 2004.

CORREIA, PR; SCORZA, FA; SILVA, SG Da. Increased basal plasma brain-derived neurotrophic factor levels in sprint runners. *Neuroscience Bulletin*, v. 27, n. 5, p. 325–329, 2011.

DAVIDSON, Patricia M; DIGIACOMO, Michelle; MCGRATH, Sarah J. The feminization of aging: how will this impact on health outcomes and services? *Health Care for Women International*, v. 32, n. 12, p. 1031–45, dez. 2011.

DAVIES, Ap; GLASGOW, Mm. Imaging in osteoarthritis: a guide to requesting plain X-rays of the degenerate knee. *The Knee*, v. 7, n. 3, p. 139–143, 1 jul. 2000.

DORSHKIND, Kenneth; MONTECINO-RODRIGUEZ, Encarnacion; SIGNER, Robert a J. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nature reviews. Immunology*, v. 9, n. 1, p. 57–62, jan. 2009.

DRELA, Nadzieja; KOZDRON, Ewa; SZCZYPIORSKI, Piotr. Moderate exercise may attenuate some aspects of immunosenescence. *BMC geriatrics*, v. 4, n. 8, p. 1–7, 29 set. 2004.

DU, Huiyun *et al.* A review of the six-minute walk test: its implication as a self-administered assessment tool. *European Journal of Cardiovascular Nursing*, v. 8, n. 1, p. 2–8, mar. 2009.

ERSHLER, W B. Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. *Journal of the American Geriatrics Society*, v. 41, n. 2, p. 176–81, fev. 1993.

FAHLMAN, M *et al.* Effects of endurance training on selected parameters of immune function in elderly women. *Gerontology*, v. 46, n. 2, p. 97–104, 2000.

FELSON, David T. Osteoarthritis of the knee. *New England Journal of Medicine*, v. 354, n. 8, p. 841–848, 2006.

FERNANDES, Marcus Ivanovith. *Tradução e validação do questionário de qualidade de vida específico para osteoartrose (WOMAC-Western Ontario and MacMaster Universities) para a língua portuguesa*. 2003. Unifesp, 2003.

FERRUCCI, Luigi *et al.* Change in muscle strength explains accelerated decline of physical function in older women with high interleukin-6 serum levels. *Journal of the American Geriatrics Society*, v. 50, n. 12, p. 1947–1954, 2002.

FOLSTEIN, MF; FOLSTEIN, SE; MCHUGH, PR. “Mini-mental state”: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*, v. 12, n. 3, p. 189–198, 1975.

FONSECA, J E *et al.* Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmunity Reviews*, v. 8, n. 7, p. 538–42, jun. 2009.

FRANCESCHI, Claudio *et al.* Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 128, n. 1, p. 92–105, jan. 2007.

FRIED, Linda P *et al.* Untangling the concepts of disability, frailty, and comorbidity: implications for improved targeting and care. *Journal of Gerontology*, v. 59, n. 3, p. 255–63, mar. 2004.

FULOP, T *et al.* Aging, frailty and age-related diseases. *Biogerontology*, v. 11, n. 5, p. 547–63, out. 2010.

GOLDRING, MB; OTERO, Miguel. Inflammation in osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology*, v. 23, n. 5, p. 471–8, set. 2011.

HAALAND, Derek a *et al.* Is regular exercise a friend or foe of the aging immune system? A systematic review. *Clinical Journal of Sport Medicine*, v. 18, n. 6, p. 539–48, nov. 2008.

HASEEB, Abdul; HAQQI, Tariq M. Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, v. 146, n. 3, p. 185–96, mar. 2013.

HOCHBERG, Marc C. *et al.* Recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care & Research*, v. 64, n. 4, p. 465–474, 27 abr. 2012.

- HUNTER, David J *et al.* Biomarkers for osteoarthritis: current position and steps towards further validation. *Best practice & research. Clinical rheumatology*, v. 28, n. 1, p. 61–71, fev. 2014.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Atlas do Censo Demográfico 2010*. Rio de Janeiro: IBGE, 2013. p. 160
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Sinopse do Censo Demográfico 2010*. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. p. 261
- KELLEGREN, JH; LAWRENCE, JS. Radiological assessment of osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis*, v. 16, n. 4, p. 494–502, 1957.
- KIECOLT-GLASER, Janice K *et al.* Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *PNAS*, v. 100, n. 15, p. 9090–5, 22 jul. 2003.
- KNAEPEN, Kristel *et al.* Neuroplasticity – Exercise-Induced Response of Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Systematic Review of Experimental Studies in Human Subjects. *Sports Medicine*, v. 40, n. 9, p. 765–801, 2010.
- KOHUT, M L *et al.* Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP, and IL-6 independent of beta-blockers, BMI, and psychosocial factors in older adults. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 20, n. 3, p. 201–9, maio 2006.
- KRABBE, Karen Suárez; PEDERSEN, Maria; BRUUNSGAARD, Helle. Inflammatory mediators in the elderly. *Experimental Gerontology*, v. 39, n. 5, p. 687–99, maio 2004.
- KÜCHEMANN, Berlindes Astrid. Envelhecimento populacional, cuidado e cidadania: velhos dilemas e novos desafios. *Revista Sociedade e Estado*, v. 27, n. 1, p. 165–180, 2012.
- LANG, T *et al.* Sarcopenia: etiology, clinical consequences, intervention, and assessment. *Osteoporosis International*, v. 21, n. 4, p. 543–59, abr. 2010.
- LINDSAY, R M. Neurotrophic growth factors and neurodegenerative diseases: therapeutic potential of the neurotrophins and ciliary neurotrophic factor. *Neurobiology of Aging*, v. 15, n. 2, p. 249–51, 1994.
- MAKAR, Tapas K *et al.* Brain derived neurotrophic factor treatment reduces inflammation and apoptosis in experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 270, n. 1-2, p. 70–6, 15 jul. 2008.
- MALAGUARNERA, L *et al.* Immunosenescence: a review. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, v. 32, n. 1, p. 1–14, fev. 2001.
- MARTELPELLETIER, J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 12, n. supp. 12A, p. 31–33, 2004.
- MASTRO, A M *et al.* Lymphocyte subpopulations in lymphoid organs of rats after acute resistance exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 31, n. 1, p. 74–81, jan. 1999.

- MOHAMED-ALI, V *et al.* Production of soluble tumor necrosis factor receptors by human subcutaneous adipose tissue in vivo. *The American Journal of Physiology*, v. 277, n. 6 Pt 1, p. E971–5, dez. 1999.
- NAUGHTON, J; SEVELIUS, G; BALKE, B. Physiological responses of normal and pathological subjects to a modified work capacity test. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, v. 3, p. 201–7, dez. 1963.
- NAUGHTON, John. Refinements in method of evaluation and physical conditioning Conditioning Before and After myocardial Infarction. *The American Journal of Cardiology*, v. 14, n. December, p. 837–843, 1964.
- OBERBACH, Andreas *et al.* Long-term exercise training decreases interleukin-6 (IL-6) serum levels in subjects with impaired glucose tolerance: effect of the -174G/C variant in IL-6 gene. *European Journal of Endocrinology*, v. 159, n. 2, p. 129–36, ago. 2008.
- OPAL, Steven M. Anti-Inflammatory Cytokines. *CHEST Journal*, v. 117, n. 4, p. 1162, 1 abr. 2000.
- OTTERNESS, I G *et al.* An analysis of 14 molecular markers for monitoring osteoarthritis : segregation of the markers into clusters and distinguishing osteoarthritis at baseline. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 8, n. 3, p. 180–5, maio 2000.
- PAGE, Phil. Research designs in sports physical therapy. *The International Journal of Sports Physical Therapy*, v. 7, n. 5, p. 482–492, 2012.
- PEDERSEN, Bente Klarlund. Muscles and their myokines. *The Journal of Experimental Biology*, v. 214, p. 337–346, 2011.
- PENNINX, BWJH; ABBAS, Haider. Inflammatory markers and physical function among older adults with knee osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology*, v. 31, n. 10, p. 2027–2031, 2004.
- PEREIRA, G B *et al.* Acute resistance training affects cell surface markers for apoptosis and migration in CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes. *Cellular immunology*, v. 279, n. 2, p. 134–9, out. 2012.
- PETERSEN, Anne Marie W; PEDERSEN, Bente Klarlund. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology*, v. 98, n. 4, p. 1154–62, abr. 2005.
- ROCHA, Natália Pessoa; REIS, Helton José; TEIXEIRA, Antônio Lúcio. Inflammaging: um novo paradigma para as ciências gerontológicas. *Geriatrics e Gerontologia*, v. 4, n. 4, p. 224–228, 2010.
- ROCKWOOD, Kenneth; STADNYK, Karen; MACKNIGHT, C. A brief clinical instrument to classify frailty in elderly people. *The Lancet*, v. 353, n. 16, p. 205–206, 1999.
- ROSENBERG, Irwin H. The epidemiologic and methodologic problems in determining nutritional status of older persons. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 50, p. 1231–1233, 1989.
- ROUBENOFF, Ronenn. The “cytokine for gerontologists” has some company. *The Journals of Gerontology: Biological Sciences*, v. 69, n. 2, p. 163–4, fev. 2014.

SAKAGUCHI, Shimon *et al.* Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International immunology*, v. 21, n. 10, p. 1105–11, out. 2009.

SANTOS, M L a S *et al.* Muscle strength, muscle balance, physical function and plasma interleukin-6 (IL-6) levels in elderly women with knee osteoarthritis (OA). *Archives of gerontology and geriatrics*, v. 52, n. 3, p. 322–326, 2011.

SAWKA, Michael N *et al.* American College of Sports Medicine position stand. Exercise and fluid replacement. *Medicine and science in sports and exercise*, v. 39, n. 2, p. 377–90, fev. 2007.

SCHÄBITZ, Wolf-Rüdiger *et al.* Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke*, v. 38, n. 7, p. 2165–72, jul. 2007.

SIMPSON, Richard J. Aging, persistent viral infections, and immunosenescence: can exercise “make space”? *Exercise and Sport Sciences Reviews*, v. 39, n. 1, p. 23–33, jan. 2011.

THOMAS, Elaine; PEAT, George; CROFT, Peter. Defining and mapping the person with osteoarthritis for population studies and public health. *Rheumatology*, v. 53, n. 2, p. 338–45, fev. 2014.

UN, United Nations. Political Declaration and Madrid International Plan of Action on Ageing. 2002, Madrid: United Nations, 2002. p. 58.

VEDOVELLI, K *et al.* Effects of increased opportunity for physical exercise and learning experiences on recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels in brain and serum of rats. *Neuroscience*, v. 199, p. 284–91, 29 dez. 2011.

WALSH, D A. Angiogenesis and arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, v. 38, n. 2, p. 103–12, fev. 1999.

WALSH, Neil P *et al.* Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exercise immunology review*, v. 17, p. 6–63, 2011.

WITARD, Oliver C *et al.* High-intensity training reduces CD8+ T-cell redistribution in response to exercise. *Medicine and science in sports and exercise*, v. 44, n. 9, p. 1689–97, set. 2012.

WONG, Laura L Rodrigues; CARVALHO, JA. O rápido processo de envelhecimento populacional do Brasil: sérios desafios para as políticas públicas. *Revista Brasileira de Estudos Populacionais*, v. 23, n. 1, p. 5–26, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. 1995, Switzerland: WHO, 1995. p. 452.

WU, Qi; HENRY, James L. Functional changes in muscle afferent neurones in an osteoarthritis model: implications for impaired proprioceptive performance. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, p. e36854 (1–10), jan. 2012.

YAMAMOTO, H; GURNEY, ME. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of Neuroscience*, v. 10, n. 11, p. 3469–3478, 1990.

ZHANG, W *et al.* OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published

through January 2009. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*, v. 18, n. 4, p. 476–99, abr. 2010.

ZHAO, Guanggao *et al.* Effects of moderate and high intensity exercise on T1/T2 balance. *Exercise immunology review*, v. 18, n. II, p. 98–114, jan. 2012.

Apêndice 1

Effect of aerobic training on plasma cytokines and soluble receptors in elderly women with knee osteoarthritis, in response to acute exercise.

Effect of aerobic training on plasma cytokines and soluble receptors in elderly women with knee osteoarthritis, in response to acute exercise

Wellington Fabiano Gomes ·
 Ana Cristina Rodrigues Lacerda ·
 Vanessa Amaral Mendonça ·
 Arthur Nascimento Arrieiro · Sueli Ferreira Fonseca ·
 Mateus Ramos Amorim · Etel Rocha-Vieira ·
 Antônio Lúcio Teixeira · Mauro Martins Teixeira ·
 Aline Silva Miranda · Cândido Cebo Coimbra ·
 Gustavo Eustáquio Alvim Brito-Melo

Received: 14 July 2011 / Revised: 8 November 2011 / Accepted: 20 December 2011 / Published online: 4 January 2012
 © Clinical Rheumatology 2012

Abstract The aim of this study was to evaluate levels of interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and soluble forms of the TNF- α receptor (sTNFR1 and sTNFR2) from plasma taken from the peripheral blood of elderly individuals presenting with osteoarthritis (OA) of the knee. These patients underwent aerobic treatment through the use of physical exercises. The study consisted of a longitudinal analysis of older individuals presenting clinical and radiographic diagnosis of knee OA that were submitted to 12 weeks of aerobic treatment. The individuals were evaluated during acute exercise or after chronic exercise. During

acute exercise (walking slowly on the mat), blood samples of the patients were collected before, immediately after, and 30 min following the end of training. After chronic exercise (aerobic walking training, three times/week for 12 weeks), patient blood samples were obtained for comparison. Additionally, clinical and functional assessments (WOMAC test and 6-min walk) were performed at the end of all physical exercises. Plasma concentrations of cytokines and soluble receptors were measured by ELISA. Aerobic training increased the plasma concentration of sTNFR1; however, it decreased the plasma concentration of sTNFR2, when compared with levels of resting patients. Acute exercise differentially affects the levels of sTNFR1 dependent on when the samples were taken, before and after aerobic training. However, the levels of sTNFR2 were not affected by training. For the population studied, we observed differences in the levels of sTNFR1 and sTNFR2 following acute and chronic exercise. Other additional factors, like the level of inactivity of the individual and the type of physical exercise that patients are exposed to, need to be considered as well. The variation in the levels of soluble receptors correlated with functional improvement; however, the inflammatory osteoarthritis markers (IL-6 and TNF- α) were unaffected by the walking exercises.

W. F. Gomes · A. C. R. Lacerda · V. A. Mendonça ·
 A. N. Arrieiro · S. F. Fonseca · M. R. Amorim · E. Rocha-Vieira ·
 G. E. A. Brito-Melo
 Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys
 (UFVJM),
 Diamantina, Minas Gerais, Brazil

W. F. Gomes (✉) · A. C. R. Lacerda · V. A. Mendonça ·
 A. N. Arrieiro · G. E. A. Brito-Melo
 Multicenter Post Graduation Program in Physiological Sciences,
 Brazilian Society of Physiology,
 Minas Gerais, Brazil
 e-mail: gomeswf@hotmail.com
 URL: www.ufvjm.edu.br/curso/Fisioterapia

A. L. Teixeira · M. M. Teixeira · A. S. Miranda · C. C. Coimbra
 Institute of Biological Sciences (ICB),
 Federal University of Minas Gerais (UFMG),
 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Keywords Cytokines · Exercise training · Inflammatory markers · Osteoarthritis · Soluble receptors

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative joint disease that primarily afflicts weight-bearing joints, in which the knee is most often affected [1, 2]. Knowledge of the pathophysiology of OA has advanced in recent years, specifically focusing on the role of inflammation [3]. OA, unlike rheumatoid arthritis, was initially thought of as a non-inflammatory disease, but more recently, the role of synovitis, bone and muscle alterations in OA has demonstrated the influence of inflammation in OA [2, 4, 5].

In addition to the several functional and morphological changes of the articular tissues, studies have shown altered inflammatory factors such as cytokines, including interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-15, IL-17, and IL-1 [3, 5–8], chemokines [9, 10], receptors [4, 11], and proteases [12, 13], mainly on the lesion focus, showing the multifactorial nature of the disease. Due to the technical difficulty and risk of obtaining the biological samples, studies have examined the behavior of these inflammatory factors in the blood [10, 14, 15]. However, none of the presently available biomarkers is sufficiently effective to aid diagnosis and prognosis of OA in either synovial fluid or blood [2].

Recently, several researchers have shown that low-intensity exercise can modulate the inflammatory response in individuals with chronic diseases [14, 16, 17]. According to Santos et al., aerobic exercise was effective in the reduction of IL-6, which has been associated with reducing symptoms of knee OA [14].

However, further studies are needed to assess how current therapeutic interventions, such as aerobic exercise composed of walking with progressive loading, modulate the inflammatory component of disease in older adults with OA of the knee [18, 19]. IL-6, TNF- α , and the soluble receptors for tumor necrosis factor sTNFR1 and sTNFR2 are modulators of inflammation [6, 11] and are influenced by physical exercise [20, 21]. These cytokines have been analyzed in osteoarthritis, unlike the soluble TNF receptors, although more sensitive and reliable markers of TNF- α activity [22].

Given the ability of exercise to reduce the inflammatory response and the need to find a marker in peripheral blood for OA, the objective of this pilot study was to correlate plasma concentrations of IL-6, TNF- α , sTNFR1 and sTNFR2 in elderly women with knee OA before and after acute exercise aerobic training with clinical and functional responses.

Method

Subjects

The study sample consisted of elderly women from the city of Diamantina, Brazil, with clinically and radiographic

diagnosed OA of the knee. All patients selected met the inclusion criteria: (1) aged 65 years and over, (2) diagnosed with OA in at least one knee based on clinical and radiographic criteria of the American College of Rheumatology [23] with radiographic classification [24], (3) has not undergone any surgical procedure in the lower limbs, (4) has no history of recent trauma on the knees, (5) does not make use of mobility aids (canes, crutches, and walkers), (6) did not undergo physical therapy or any other procedure for rehabilitation in the last 3 months, (7) presents with clinical conditions and cognitive requirements for the exercises, (8) was observed by Mini-Mental State Examination (MMSE) [25, 26], and (9) not make use of any immunosuppressive medication. Patients unable to finish the test run, used to determine the physical capability required to complete this study, were removed from the study.

Procedures

First, volunteers received a detailed explanation about the objectives and procedures of the study. Thereafter, they underwent the MMSE to verify cognitive impairment. Those volunteers who obtained a score above the cutoff (13 for illiterate individuals; 18 for those with 1 to 3 years of education; 23 for those with 4 to 7 years of education; and 26 points for those with over 7 years of education) signed a consent form, and their demographic data were collected. Following consent and demographic data collection, patients were subjected to the maximal exercise test on a treadmill to determine their physical capacity for the required training in the study. One week later, patients were clinically and functionally assessed. Additionally, blood samples were collected from patients before, immediately after, and 30 min following acute exercise. We aseptically collected 6 mL of whole blood using heparin as an anticoagulant. The acute exercise protocol previously administered and blood sample collections (before, immediately after, and 30 min following acute exercise) were repeated at an additional later time point, which was 12 weeks after aerobic training walks for the same patients.

The interventions and blood draws were always collected in the morning for all volunteers. All subjects were evaluated at the same time, and the biological samples were processed within 24 h after collection. In addition, the concentrations of cytokines and receptors were determined by ELISA with all samples in the same assay. The research project was approved by the ethics committee of UFVJM record (057/08).

Radiographic evaluation

To ensure that the participants had knee OA and to reliably standardize the samples, radiological evaluation was

performed on all volunteers. Anteroposterior, oblique, and lateral images of the affected knee were taken in standing [27]. Radiological classification was made in accordance with the Kellgren–Lawrence [24].

Cytokines and soluble TNF receptors analysis

The concentration of cytokines and soluble TNF receptors in the plasma of volunteers was measured using sandwich ELISA kits for TNF- α , sTNFR1, sTNFR2, and IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, MN). Specifically, the human IL-6 detection kit was highly sensitive. The detection limits for these assays were 5 pg/mL for TNF- α , sTNFR1, and sTNFR2; 0.14 pg/mL for IL-6.

Clinical and functional parameters

The self-report of pain, stiffness, and physical function was assessed with a 24-item questionnaire from the Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC) [28, 29], which is a valid and reliable instrument for OA. This questionnaire was translated and adapted to Portuguese [30]. Direct analysis of the functional performance of the volunteers was conducted with the 6-min walk (6MWT) test [31].

Physical performance test

To quantify physical performance, a progressive exercise test until fatigue was performed on a treadmill. Heart rate was recorded every 30 s during the test using a heart rate monitor, and Borg's rating of perceived exertion (RPE) was determined every 3 min during the test. The test was stopped, and maximal exertion was said to be reached if a score of more than 18 on the Borg scale (RPE) and/or volitional fatigue was reported [32]. In addition, the test was discontinued in the event of dizziness, nausea, blurred vision, dyspnea, chest pain, elevated diastolic blood pressure to 120 mmHg, sustained drop in systolic blood pressure (SBP), or marked elevation of SBP to 260 mmHg. These procedures were observed by a researcher and a physician. The maximum oxygen consumption (VO_{2max}) was determined. VO_{2max} was calculated based on the slope grade (G) and speed (S) during the last stage of the test completed by the subject according to the following equation (25): $VO_2 = (0.1 \times S) + (1.8 \times S \times G) + 3.5$ [33].

Exercise

All volunteers were subjected to two distinct types of exercises. The first consisted of a light walk on a treadmill. In this study, the light walk qualified as acute exercise because it is the stress under which we analyzed blood samples at the

acute phase. We collected blood samples at three different time points (pre-exercise acute, post-acute exercise, and 30 min of recovery). The second type of exercise the volunteers were subjected to was a training program aimed at determining the effects of chronic exercise. For chronic exercise, the volunteers underwent walk training, three times per week for 12 weeks, as suggested by Halland et al. [21]. After the training period, volunteers were assessed as previously done following acute exercise.

Acute exercise

Exercise consisted of walking on a treadmill. Volunteers started by warming up for 2 min (1 mph). Following the warm up, the speed was increased to 2 mph and remained constant until the end of the exercise (+18 min). The treadmill had no inclination (0%), and the duration of exercise was 20 min. After the exercise, the volunteer was asked to lie down for 30 min to allow for recovery time.

Training

Training consisted of walking with a progressive increase in the exercise load. This was performed three times per week on alternating days, for 12 weeks straight. Each volunteer wore a heart monitor with an audible alarm system calibrated to ensure the range of training heart rate achieved determined during the physical performance test for the duration of training. The exercise consisted of three distinct stages: warm up (5 min), aerobic exercise–walking (initially 30 min, 70% HRmax), and cool down (5 min). The volume of aerobic exercise was individually prescribed and changed gradually in 5-min increments every 2 weeks (30 min in the first week and up to 55 min in the last week) with a similar progression for target heart rate training (70% HRmax 1st to 3rd week, 75% HRmax the 4th to 7th week, and 80% HRmax from 8th to 12th week).

Statistical analysis

Descriptive analysis and normality tests were performed using the statistical package GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). How the data were normally distributed, statistical analysis was performed to test the factorial using ANOVA with split plot (2 \times 3) with post hoc Bonferroni. Results were considered statistically significant at a significance level of 5%.

Results

Fifteen volunteers with a clinical and a radiographic diagnosis of OA were included in the study. Descriptive data of

the volunteer samples are presented in Table 1. Plasma levels of sTNFR1 and sTNFR2 are shown in Fig. 1. Plasma concentrations of these soluble receptors were measured at three different time points following the training period (volunteers at rest, immediately after acute exercise, and after 30 min of recovery).

Acute exercise increased plasma concentrations of sTNFR1 immediately following exercise compared to patient samples taken before aerobic training (Fig. 1a (a)). Elevated levels of sTNFR1 persisted for up to 30 min (Fig. 1a (b)) in the recovery phase, as compared to plasma concentrations at the sample from volunteers at rest. After training, we observed no changes in plasma concentrations of sTNFR1 immediately after intense exercise. However, there was a reduction 30 min following exercise, as compared with samples from volunteers at rest (Fig. 1a (c)).

Plasma concentrations of sTNFR2 were reduced immediately following acute exercise (Fig. 1b (a)) and persisted for 30 min (Fig. 1b (b)) during recovery, as compared with samples from volunteers at rest. Additionally, after training we observed that there was no change in plasma sTNFR2 immediately after intense exercise, but this was followed by a reduction 30 min after (Fig. 1b (d)) during recovery, as compared with samples from volunteers at rest.

sTNFR1 concentrations at all time points (pre-exercise acute, post-acute exercise, and 30 min of recovery) were statistically different after training (Fig. 1a (e–g)). As for concentrations of sTNFR2, only the pre-acute exercise was different between samples taken before and after training (Fig. 1b (e)), seen with a reduced plasma concentration from training.

It is noteworthy that aerobic training increased plasma concentrations of sTNFR1 (Fig. 1a (e)) and reduced plasma concentrations of sTNFR2 (Fig. 1b (e)) when compared to the resting (before the acute exercise). There was no significant change in plasma concentrations of IL-6 and TNF for both acute exercise and training (chronic exercise) in volunteers with knee OA (Table 2).

Figure 2 shows the correlation between the training effect (delta analysis: variation between times pre- and post-training) on plasma sTNFR1, self-perceived physical function (a), and the 6-min walking test (b). Increased concentrations of plasma sTNFR1 with exercise training are associated with reductions in WOMAC scores for the domain physical function ($r=-0.519$, $p=0.034$) and increased

distance walked during the 6MWT ($r=0.628$, $p=0.010$). This demonstrates both clinical and functional improvement of patients.

Additionally, we found a correlation between changes in plasma concentrations of TNF- α and WOMAC scores for the domain physical function ($r=0.501$, $p=0.034$). This shows a direct correlation with functional deterioration and higher plasma concentrations of this cytokine (data not shown).

Discussion

The highlight of our pilot work is that it assesses the serum levels of TNF- α , their receptors, and IL-6 in elderly patients with knee OA comparing the training effect (chronic exercise) to acute exercise. Twelve weeks of aerobic training increased the plasma concentrations of sTNFR1 and decreased those of sTNFR2. Similarly, mild exercise for 20 min on the treadmill (before training) also increased the levels of sTNFR1 (before training) and also reduced sTNFR2, and these changes persisted for 30 min after the activity. Moreover, there were no changes in plasma concentrations of TNF- α and IL-6 following both exercise treatments.

Even though our findings do not agree with previous studies that found no changes of soluble receptors with training [34] or who report a negative correlation between levels of sTNFR1 with functional status and pain scores [6], our study is consistent with the basic concept for a direct modulator role of this soluble receptor on the effects of TNF- α . Specifically, the high concentrations possibly indicate an active inflammatory process, but not that the levels of sTNFR1 are a cause of the inflammation, but rather an attempt to control or inactivate TNF- α [4, 20].

We analyzed the soluble receptors for TNF- α because they are described as being more stable in circulation and thus better markers of chronic inflammation [6]. Our findings show that the levels of sTNFR1 and sTNFR2 are maybe inversely regulated during the course of training. Penninx et al. [6] evaluated the correlation between cytokines and soluble receptors and found that the highest correlation (Spearman $r=0.81$) was between sTNFR1 and sTNFR2. Moreover, these receptors were associated with IL-6 and TNF- α .

Braunsgaard et al. [34] in 2004 found no change in sTNFR1 with chronic exercise but described an inverse correlation between plasma levels of this receptor before training with the muscle strength of the knee flexors and extensors after endurance training for 12 weeks. This finding demonstrates that high levels of sTNFR1 represent low-grade inflammation present in nonagenarian elderly, which could negatively influence the training capacity of these

Table 1 Baseline characteristics of volunteers ($n=15$)

	Mean (\pm SD)
Age (year)	67 \pm 4
Mass (kg)	66.90 \pm 11.80
Height (m)	1.54 \pm 0.07
BMI (kg/m ²)	27.80 \pm 4.1

SD standard deviation, BMI/body mass index

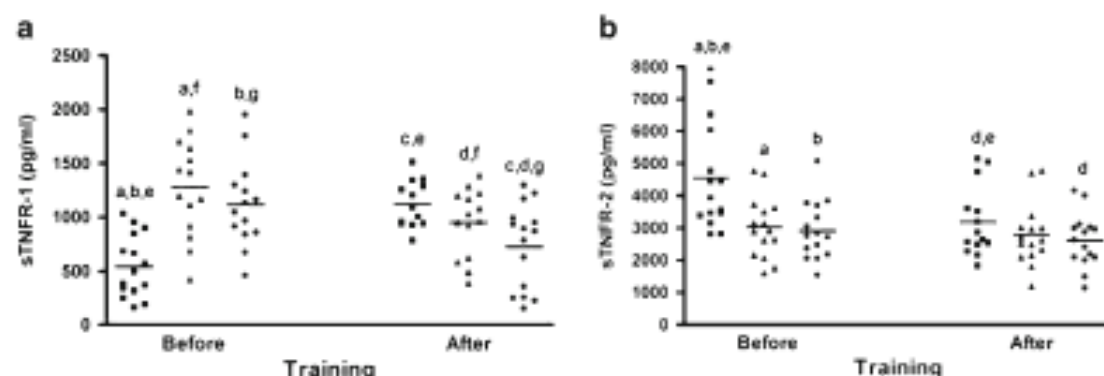


Fig. 1 Plasma concentrations of sTNFR1 (a) and sTNFR2 (b) of elderly women with knee osteoarthritis ($n=15$) before and after training for 12 weeks. Samples were taken at pre-acute exercise (black square), post-acute exercise (black triangle), and after 30 min of

recovery (black circle). The horizontal lines (in bold) indicate the average values. The top letters indicate that statistical differences were found, and a and b mean $p<0.001$; c and g mean $p<0.01$; and d and f mean $p<0.05$. Statistical analysis was performed with ANOVA 2×3

individuals. In a recent study, Coelho et al. found that concentrations of sTNFR1 were higher in elderly subjects when compared to younger subjects living in the same community and that these concentrations correlated with the age of volunteers [35].

It is interesting to note that the elderly in our study lived in the community, but had knee OA, which could explain the higher plasma concentrations of sTNFR1 before training. Additionally, these increased plasma concentrations reflect low-grade inflammation. After training, the mean plasma concentration of sTNFR1 was even greater, which could not be simply explained as an increase of the inflammatory process. Volunteer behavior was different before and after acute exercise, which could be influenced by different concentrations of sTNFR1.

Unlike sTNFR1, sTNFR2 had reduced plasma concentrations with chronic training and also showed lower plasma concentrations after acute exercise. Opal et al. [36] showed the role for sTNFR2 agonist with respect to TNF- α , which when complexed with TNF- α prolongs its half-life. By increasing the TNF- α half-life the sTNFR2 agonist thus promotes its pro-inflammatory activity.

It seems that the agonistic or antagonistic effect of the soluble receptors is related to whether they are acting locally or systemically. Plasma concentrations of sTNFR2 are naturally higher in patients with OA [37], and exercise could modulate this phenomenon [20], promoting greater joint protection.

TNF- α is an inflammatory cytokine that appears to play an important role in the onset and progression of cartilage destruction [6]. Our study detected no change in plasma concentrations of TNF- α , despite its pivotal role in low-grade inflammation. This finding may be related to the instability of this cytokine, which has a short half-life that can vary over the course of the day [6]. TNF- α production by muscles after exercise seems to remain local in that tissue, making systemic detection unlikely [34]. Moreover, the volume of training utilized in this study for the elderly may not have been enough to trigger detectable amounts of TNF- α . In another study consisting of 12 weeks of intervention, but using muscular resistance training, the authors also found no changes in TNF- α [34]. Kohut et al. in 2006 found a reduction of TNF- α with chronic aerobic exercise [38]. Even without changes in plasma concentrations from

Table 2 Plasma concentrations (picograms per milliliter) of cytokines and soluble receptors of elderly women with knee osteoarthritis ($n=15$) before and after training for 12 weeks

	Before training				After training				<i>p</i>	<i>d</i>
	Mean	95% CI		SD	Mean	95% CI		SD		
		Lower	Upper			Lower	Upper			
IL-6	1.7	−0.02	3.5	2.8	1.2	0.8	1.7	0.8	>0.05	0.343
TNF	37.8	−6.0	81.63	20.1	72.0	8.4	135.6	105.2	>0.05	0.638
sTNFR1	540.7	380.6	700.8	289.1	1,120.0	999.2	1,241.0	209.2	<0.001	3,246
sTNFR2	4,542.8	3,608.0	5,478.0	1,688	3,177.5	2,596.0	3,759.0	1,060.0	<0.001	1,373

CI confidence interval, *d* = power (Cohen's *d*), SD standard deviation

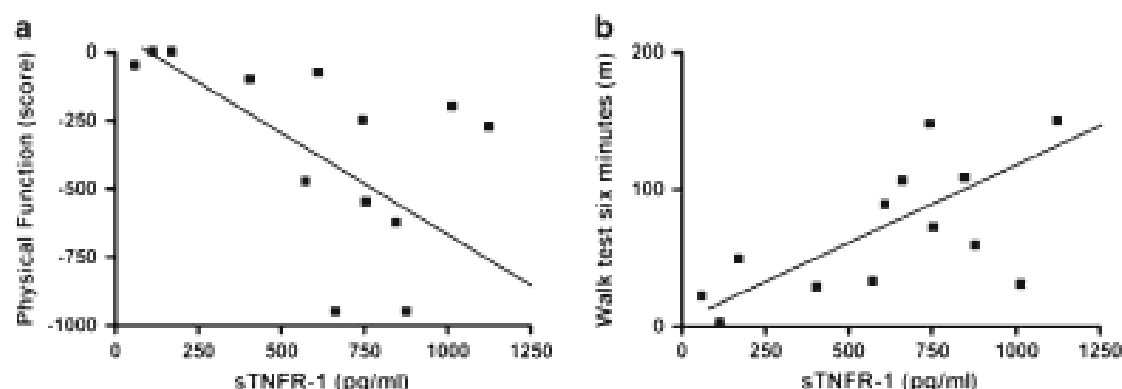


Fig. 2 Correlation between the effect of training on plasma (Δ) of sTNFR1 (a, b) in elderly women with knee osteoarthritis and the scores (Δ) of the WOMAC physical function (a) and distance

(Δ) when tested against 6-min walk (b). The statistical analysis was Pearson correlation

the exercises, TNF- α was negatively correlated with physical function in our findings.

The role of IL-6 in OA and exercise is controversial. Our study found no changes in plasma IL-6, which agrees with the study by Bruunsgaard et al. [34] in which resistance training in the elderly also did not result in any changes. Additionally, increased plasma levels of IL-6 have been considered an indicator for sarcopenia, which is the loss of muscle mass and physical function. Sarcopenia is an aggravating factor that results in the progression of knee OA [14, 39]. In a study of 80 elderly patients with OA, Santos et al. [14] found no correlation between IL-6 and functionality, but found an inverse correlation with the strength of knee flexor muscles. Our seniors initially had high plasma levels of IL-6 (6.31 pg/mL), but showed no correlation with functionality. This result is true even when the reported cutoffs are around 3 pg/mL [14].

IL-6 is a pleiotropic cytokine with some studies showing that this cytokine is pro-inflammatory [7], whereas others show that it is an anti-inflammatory cytokine [36]. These conflicting results lead us to the conclusion that IL-6 is a modulator of inflammation. Opal et al. [36] reported that IL-6 negatively regulates the synthesis of IL-1 and TNF- α and promotes the synthesis of sTNFR1. The fact is that IL-6 plays an important role in inflammatory arthropathies and is present in synovial fluid, but its precise role in these diseases is actively being investigated [20].

Despite the limitations about making firm conclusions about the cause and effect of disease in studies analyzing correlations between variables, our findings show the possible benefits of current interventions for OA by showing that increases in sTNFR1 are associated with improved walking distance and physical function. However, these associations are also controversial in the literature. Penninx et al. [6] found an inverse correlation, where high plasma levels were associated with lower functional capacity. Unlike our experimental design, this study was a cross-

sectional study with a single blood collection. Our study consisted of a 12-week training regimen that allowed for longitudinal analysis of sTNFR1 in response to acute exercise. In sedentary individuals, walking on the treadmill (acute exercise) increased plasma concentrations of sTNFR1. After 12 weeks of training, the same exercise reduced these concentrations. Our hypothesis is that training these individuals resulted in increased levels of sTNFR1 that were able to act to limit inflammation in advance of acute exercise. Plasma concentrations of sTNFR2 were not correlated with the domains of the WOMAC or with the 6MWT (data not shown).

Finally, the training used in this study was aerobic walking, and each specific type of training can have variable effects that determine different cascades of cellular events. It is, therefore, important that studies with other types of training (resistance exercise and muscle power) and other categories of volunteers (stratification by severity of OA) must be conducted to better understand the effects of different exercise regimens for the treatment of knee osteoarthritis.

There are limits to interpreting the results of this longitudinal study because it is a pilot study. Therefore, the present study needs to be confirmed in a random large sample of patients with stratification of the disease by phenotypes and inclusion of males and a control group. We cannot exclude the possibility that the phenomenon observed with the cytokines and the soluble receptors in the patients with OA in this study was an epiphenomenon reflecting some unknown mechanisms. The relationship between the types and concentrations of biomarkers in joint and plasma should be investigated further.

Our results showed that chronic exercise increases plasma sTNFR1 and that these concentrations correlate with functional improvement. However, the levels of soluble receptors following acute exercise depend on the initial concentrations. Plasma concentrations of sTNFR2 are

reduced with training and acute exercise. These findings indicate that the levels of sTNFR1 and sTNFR2 maybe are not similarly regulated based on this study with this specific cohort. Importantly, these receptors may have distinct roles in modulating inflammation in osteoarthritis, which depends on the plasma concentration, the level of inactivity of the individual, and the type of exercise. This tenet needs to be addressed in further studies and in the general population with knee osteoarthritis.

Acknowledgments The authors are grateful to the Brazilian Society of Physiology and Santa Casa de Caridade Hospital of Diamantina.

Financial support This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Disclosures None.

References

1. Felson DT (2006) Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* 354(8):841–848. doi:10.1056/NEJMcp051726
2. Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP (2011) Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 377 (9783):2115–2126. doi:10.1016/S0140-6736(11)60243-2
3. Shane Anderson A, Loeser RF (2010) Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24(1):15–26. doi:10.1016/j.benh.2009.08.006
4. Martel-Pelletier J (2004) Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* 12(Suppl A):S31–S33
5. Levinger L, Levinger P, Tienerry MK, Feller JA, Bartlett JR, Bergman N, McKenna MJ, Cameron-Smith D (2011) Increased inflammatory cytokine expression in the vastus lateralis of patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 63(5):1343–1348. doi:10.1002/art.30287
6. Penninx BW, Abbas H, Ambrosius W, Nicklas BJ, Davis C, Messier SP, Pahor M (2004) Inflammatory markers and physical function among older adults with knee osteoarthritis. *J Rheumatol* 31(10):2027–2031
7. Fonseca JE, Santos MJ, Carbas H, Choy E (2009) Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun Rev* 8(7):538–542. doi:10.1016/j.autrev.2009.01.012
8. Orita S, Koshi T, Mitsuoka T, Miyagi M, Inoue G, Ami G, Ishikawa T, Hamaoka E, Yamashita K, Yamashita M, Eguchi Y, Toyone T, Takahashi K, Ohtsui S (2011) Associations between proinflammatory cytokines in the synovial fluid and radiographic grading and pain-related scores in 47 consecutive patients with osteoarthritis of the knee. *BMC Musculoskelet Disord* 12:144. doi:10.1186/1471-2474-12-144
9. Saetan N, Hoonwark S, Tanavalee A, Tantavirut S, Yuktanandana P, Pankjan V (2011) Association of plasma and synovial fluid interleukin-10 with radiographic severity in knee osteoarthritis. *Clin Biochem*. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.07.010
10. Pienochala AW, Kusz DJ, Hajduk G (2011) CXCL8 and OCL5 expression in synovial fluid and blood serum in patients with osteoarthritis of the knee. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 59 (2):151–155. doi: 10.1007/s00005-011-0115-4
11. Miller GD, Nicklas BJ, Loeser RF (2008) Inflammatory biomarkers and physical function in older, obese adults with knee pain and self-reported osteoarthritis after intensive weight-loss therapy. *J Am Geriatr Soc* 56(4):644–651. doi:10.1111/j.1532-5415.2007.01636.x
12. Troeberg L, Nagase H (2011) Proteinases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta*. doi:10.1016/j.bbaap.2011.06.020
13. Wasilew GI, Lehnigk U, Duda GN, Taylor WR, Matziolis G, Dyrnybil C (2010) The expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in the synovial membranes of patients with osteoarthritis compared with traumatic knee disorders. *Arthroscopy* 26(8):1096–1104. doi:10.1016/j.arthro.2009.12.018
14. Santos MLAS, Gomes WF, Pereira DS, Oliveira DMG, Dias JMD, Ferrioli E, Pereira LSM (2011) Muscle strength, muscle balance, physical function and plasma interleukin-6 (IL-6) levels in elderly women with knee osteoarthritis (OA). *Arch Gerontol Geriatr* 52 (3):322–326. doi:10.1016/j.archger.2010.05.009
15. Golightly YM, Marshall SW, Knus VB, Renner JB, Villavozes A, Castiel C, Jordan JM (2011) Biomarkers of incident radiographic knee osteoarthritis: do they vary by chronic knee symptoms? *Arthritis Rheum* 63(8):2276–2283. doi:10.1002/art.30412
16. Calle MC, Fernandez ML (2010) Effects of resistance training on the inflammatory response. *Nutr Res Pract* 4(4):259–269. doi:10.4162/nrp.2010.4.4.259
17. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Woods JA, Bishop NC, Fleshner M, Green C, Pedersen BK, Hoffman-Goetz L, Rogers CJ, Northoff H, Abbasi A, Simon P (2011) Position statement. Part one: immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev* 17:6–63
18. Chodzko-Zajko WJ, Proctor DN, Fiatarone Singh MA, Minson CT, Nigg CR, Salem GJ, Skinner JS (2009) American College of Sports Medicine Position Stand. Exercise and physical activity for older adults. *Med Sci Sports Exerc* 41(7):1510–1530. doi:10.1249/MSS.0b013e3181a0c95c
19. Bruunsgaard H, Pedersen BK (2000) Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: effects of exercise on the immune system in the elderly population. *Immunol Cell Biol* 78(5):523–531. doi:10.1111/j.1440-1711.2000.x01-14-.x
20. Petersen AM, Pedersen BK (2005) The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 98(4):1154–1162. doi:10.1152/japplphysiol.00164.2004
21. Hurland DA, Sabljic TP, Barilbeau DA, Mukozovov IM, Hart LE (2008) Is regular exercise a friend or foe of the aging immune system? A systematic review. *Clin J Sport Med* 18(6):539–548. doi:10.1097/JSM.0b013e318181865ec
22. Korfel Z, Remick DG (2000) Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry* 157(5):683–694
23. Aulen N, Nevitt MC (2006) Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20(1):3–25. doi:10.1016/j.benh.2005.09.007
24. Kelgren JH, Lawrence JS (1957) Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* 16(4):494–502
25. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) "Mini-mental state." A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12(3):129–138
26. Benolucci PH, Brucki SM, Campacci SR, Juliano Y (1994) The Mini-Mental State Examination in a general population: impact of educational status. *Arg Neuropsiquiatr* 52(1):1–7
27. Davies AP, Glasgow MM (2000) Imaging in osteoarthritis: a guide to requesting plain X-rays of the degenerate knee. *Knee* 7(3):139–143
28. Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW (1988) Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to anti-rheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J Rheumatol* 15(12):1833–1840

29. Basaran S, Guzel R, Seydaoglu G, Guler-Uysal F (2010) Validity, reliability, and comparison of the WOMAC osteoarthritis index and Lequesne algofunctional index in Turkish patients with hip or knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 29(7):749–756. doi:10.1007/s10067-010-1398-2
30. Fernandes MI (2002) Tradução e validação do questionário de qualidade de vida específico para osteoartrose (WOMAC-Western Ontario and MacMaster Universities) para a língua portuguesa. UNIFESP, São Paulo
31. Pires S, Oliveira A, Pereira V, Brito R (2007) Six-minute walk test at different ages and body mass indexes. *Revista Brasileira de Fisioterapia* 11:147–151
32. Yoon BK, Kravitz L, Roberts R (2007) VO2max, protocol duration, and the VO2 plateau. *Med Sci Sports Exerc* 39(7):1186–1192. doi:10.1249/mss.0b13e318054e304
33. Chen MJ, Fan X, Moe ST (2002) Criterion-related validity of the Borg ratings of perceived exertion scale in healthy individuals: a meta-analysis. *J Sports Sci* 20(11):873–899
34. Bruunsgaard H, Bjerregaard E, Schroll M, Pedersen BK (2004) Muscle strength after resistance training is inversely correlated with baseline levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the oldest old. *J Am Geriatr Soc* 52(2):237–241
35. Coelho FM, Narciso FM, Oliveira DM, Pereira DS, Teixeira AL, Teixeira MM, Souza DG, Pereira LS (2010) sTNF-1 is an early inflammatory marker in community versus institutionalized elderly women. *Inflamm Res* 59(2):129–134. doi:10.1007/s00011-009-0079-6
36. Opal SM, DePalo VA (2000) Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117(4):1162–1172
37. Otterness IG, Swindell AC, Zimmerer RO, Poole AR, Ionescu M, Weiner E (2000) An analysis of 14 molecular markers for monitoring osteoarthritis: segregation of the markers into clusters and distinguishing osteoarthritis at baseline. *Osteoarthr Cartil* 8(3):180–185. doi:10.1053/joca.1999.0288
38. Kohut ML, McCann DA, Russell DW, Konopka DN, Cumick JE, Franke WD, Castillo MC, Reighard AE, Vanderah E (2006) Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP, and IL-6 independent of beta-blockers, BMI, and psychosocial factors in older adults. *Brain Behav Immun* 20(3):201–209. doi:10.1016/j.bbi.2005.12.002
39. Ferrucci L, Penninx BW, Volpato S, Harris TB, Bandeen-Roche K, Balfour J, Leveille SG, Fried LP, Mc JM (2002) Change in muscle strength explains accelerated decline of physical function in older women with high interleukin-6 serum levels. *J Am Geriatr Soc* 50(12):1947–1954

Apêndice 2

Effect of exercise on the plasma BDNF levels in elderly women with knee osteoarthritis.

Effect of exercise on the plasma BDNF levels in elderly women with knee osteoarthritis

Wellington F. Gomes · Ana Cristina R. Lacerda · Vanessa A. Mendonça ·
 Arthur N. Arrieiro · Sueli F. Fonseca · Mateus R. Amorim · Antônio L. Teixeira ·
 Mauro M. Teixeira · Aline S. Miranda · Cândido C. Coimbra · Gustavo E. A. Brito-Melo

Received: 16 May 2013 / Accepted: 20 May 2013 / Published online: 6 June 2013
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Knee osteoarthritis is a common disease in the elderly population worldwide. The alleviation of the symptoms associated with this disease can be achieved with physical exercise that induces a cascade of molecular and cellular processes. Of the neurotrophins, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) appears to be the most affected by physical activity. Moreover, BDNF seems to have a negative modulatory role in inflammation, and its production by skeletal muscle cells or by cells of the immune system drives the immunoprotective role of physical activity in situations of chronic inflammation. Therefore, the aim of this study was to evaluate plasma BDNF concentrations in elderly individuals presenting with knee osteoarthritis. To accomplish this, sixteen volunteers (mean age 67 ± 4.41 years) presenting with clinically and radiographically diagnosed knee osteoarthritis were evaluated during acute exercise (1 session of 20 min on a treadmill) and after chronic exercise (12 weeks of aerobic training, consisting of a 50-min walk 3 times per week). Additionally, both a functional assessment (during a 6-min walk) and a pain perception assessment were performed at the start and at the end of physical exercises (training). The plasma BDNF concentrations were measured by ELISA. For the population studied, acute exercise increased the

levels of BDNF only before the 12-week training period ($p < 0.001$). Moreover, the training augmented the plasma concentrations of BDNF ($p < 0.0001$) and improved clinical parameters (functional $p < 0.001$; pain perception $p < 0.01$).

Keywords Acute exercise · Chronic exercise · Brain-derived neurotrophic factor · Osteoarthritis · Knee · Older people

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a chronic, degenerative joint disease that primarily afflicts weight-bearing joints. The prevalence of symptomatic knee OA has increased substantially over the past 20 years [1]. OA was initially thought to be a noninflammatory disease, but the roles of synovitis, bone and muscle alterations in OA have demonstrated the influence of inflammation and have shown that OA is a disease not only of the cartilage but also of the joints, with systemic consequences throughout the human body [2–4]. The deterioration of muscle performance and the integrity of other periarticular tissues, in addition to sensory deficits, can be directly related to the severity and progression of OA [5], but not necessarily to age [6].

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a member of the neurotrophic protein family that aids in the differentiation, survival and maintenance of specific neuronal populations [7]. This protein is found in central nervous system tissue, muscle tissue and peripheral blood [8]. BDNF prevents neuronal death during stress and also acts in the maturation of neurons [9]. Moreover, BDNF seems to have a negative modulatory role in inflammation [10], and its production by skeletal muscle cells or by cells of the

W. F. Gomes (✉) · A. C. R. Lacerda · V. A. Mendonça ·
 A. N. Arrieiro · S. F. Fonseca · M. R. Amorim ·
 G. E. A. Brito-Melo

Integrated Center for Graduate Studies and Research Health
 (CIPq-Health), Federal University of the Jequitinhonha and
 Mucuri Valleys (UFVJM), Diamantina, Minas Gerais, Brazil
 e-mail: wellingtonufvjm@gmail.com

A. L. Teixeira · M. M. Teixeira · A. S. Miranda · C. C. Coimbra
 Institute of Biological Sciences (ICB), Federal University of
 Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

immune system drives the immunoprotective role of physical activity in situations of chronic inflammation [11].

In a recent review, Pedersen [12] cited physical inactivity as a determinant for the activation of a systemic inflammatory network of pathways in chronic disease, as physical exercise (muscle contraction) is an important modulator that influences the production of cytokines such as BDNF. Recent studies have demonstrated that moderate exercises increase the basal concentrations of BDNF in healthy young adults [13] and in the elderly [14, 15].

The aim of this study was to assess the impact of exercise (acute and chronic) on plasma BDNF concentrations in elderly women with knee OA and to identify correlations with functional parameters.

Methods

This is a quasi-experimental study that includes women from the general community of the city of Diamantina, Brazil. The study protocol for this work was approved by the Ethics Committee at the Federal University of the Jequiinhonha and Mucuri Valleys (101/09), and the rights of the subjects were protected.

Subjects

The study sample consisted of elderly women (≥ 65 years old) diagnosed with OA of the knee based on clinical and radiographic criteria of the American College of Rheumatology. Only women were included in the study to avoid gender bias.

Procedures

The demographic data were then collected after the inclusion criteria had been met. After giving informed consent, the patients were subjected to the maximal exercise test on a treadmill to determine their physical capacity for the required training in the study. One week later, the patients were clinically and functionally assessed. Additionally, blood samples were collected before, immediately after and 30 min following acute exercise. The clinical and functional assessments and blood sample collections were repeated at the conclusion of the 12-week training programme.

BDNF measurement

For plasma processing, 6 mL of whole blood was collected from the antecubital vein using aseptic techniques and heparin as an anticoagulant. The blood was then centrifuged, and the plasma was stored at -80°C . The

concentration of the neurotrophic factor in the plasma of volunteers was measured using BDNF sandwich ELISA kits (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. The detection limit for this assay was 5 pg/mL.

Functional parameters and aerobic capacity

Self-reported pain was assessed with the visual analogue scale (VAS) [16]. Direct analysis of the functional performance of the volunteers was conducted with the 6-min walk test [17]. To determine aerobic capacity, a progressive exercise test was performed on a treadmill until the volunteers reached a state of fatigue, as determined by the heart rate (HR) or by a Borg rating on the perceived exertion scale (PES). The test was stopped and considered maximal if at least one of the following criteria was met: volunteers reached a score of more than 18 on the Borg scale or volitional fatigue [18].

Protocols of exercise interventions

All volunteers performed two distinct types of exercises. The first consisted of a light walk on a treadmill. In this study, light walking was defined as acute exercise, and blood samples were collected during this phase. We collected blood samples at three different time points (pre-exercise acute, post-acute exercise and after 30 min of recovery). The second type of exercise consisted of a training programme aimed at determining the effects of chronic exercise. For chronic exercise, the volunteers underwent walk training (aquatic and land) three times per week for 12 weeks, as suggested by Haaland et al. [19]. After the training period, the volunteers were assessed in the same way as after acute exercise.

Acute exercise

Acute exercise consisted of walking on a treadmill. The volunteers started by warming up for 2 min (at 1 mph). Following the warm-up, the speed was increased to 2 mph and remained constant until the end of the exercise (18 min). The treadmill had no inclination (0 %), and the duration of the exercise was 20 min. After the exercise, the volunteers were asked to lie down for 30 min of recovery time.

Training

Training consisted of walking with a progressive increase in the exercise load. The training was performed three times per week on alternating days for 12 weeks straight. Each volunteer wore a heart monitor (F4, POLAR[®]) with

an audible alarm system calibrated to ensure that the training heart rate (HR) remained within the desired range during the physical performance test. The exercise consisted of three distinct stages: warm-up (5 min), aerobic exercise—walking (initially 30 min, 70 % HRmax)—and cool down (5 min). The volume of the aerobic exercise was individually prescribed and increased gradually in 5-min increments every 2 weeks (30 min in the first week and up to 55 min in the last week), with a similar progression for target heart rate training (70 % HRmax in the first to third weeks, 75 % HRmax in the fourth to seventh weeks and 80 % HRmax in the eighth to twelfth weeks).

Statistical analysis

Descriptive analysis and normality tests were performed using the statistical package GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Statistical analysis was performed using repeated measures ANOVAs with a post hoc Bonferroni correction and paired Student's *t* tests. The interactions were analysed using factorial split-plot ANOVAs (2 × 3). The results were considered statistically significant at a significance level of 5 %.

Results

The results of the BDNF concentrations are expressed in pg/mL. The samples were evaluated from sixteen volunteers with a clinical and radiographic diagnosis of OA (Fig. 1).

Acute effect

The plasma concentrations of BDNF were measured at three different time points during acute exercise (volunteers at rest, immediately after acute stimulus and after 30 min of recovery) to determine the immediate fluctuations in the levels of this biomarker (Fig. 2). Acute exercise

increased the plasma concentrations of BDNF immediately following exercise (7.693 ± 4.454 pg/mL before exercise, compared to 12.242 ± 3.806 pg/mL immediately following exercise, $p < 0.001$). The elevated levels of BDNF persisted for up to 30 min in the recovery phase compared to the plasma concentrations from the volunteers at rest (recovery 11.190 ± 3.847 pg/mL, $p < 0.001$). Following the training programme, acute exercise did not increase BDNF levels (data not shown).

Chronic effect

The aerobic training programme increased the resting BDNF plasma concentrations compared to pre-training concentrations in elderly women with knee OA ($8,343 \pm 3,690$ pg/mL before training and $14,027 \pm 4,361$ pg/mL after training, $p < 0.001$), as shown in Fig. 3.

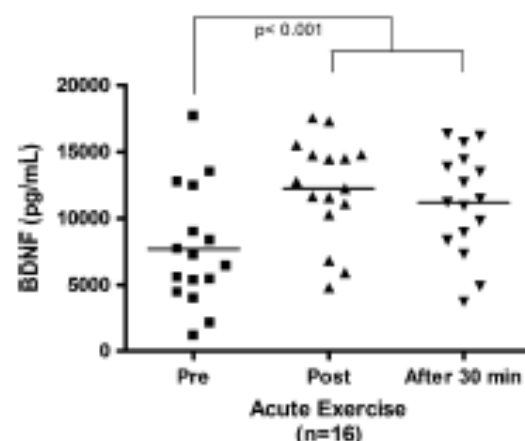


Fig. 2 Plasma concentrations of BDNF in elderly women with knee osteoarthritis ($n = 16$) before training, during pre-acute exercise, immediately post-acute exercise and 30 min post-acute exercise. The horizontal lines indicate the mean values. Statistical analysis was performed with repeated measures ANOVAs and post hoc Bonferroni corrections

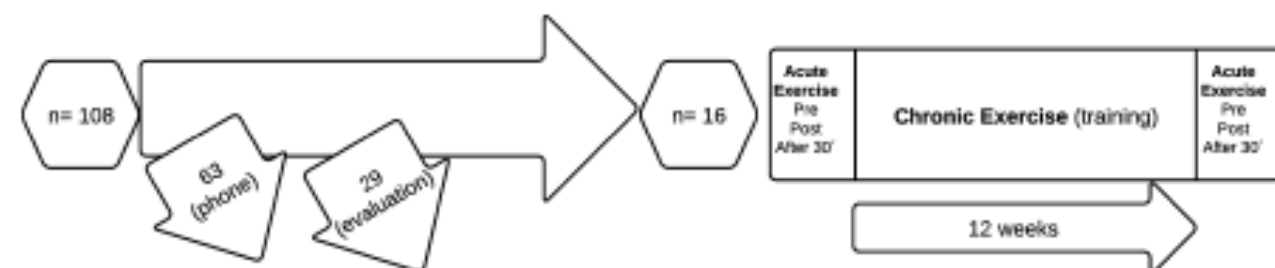


Fig. 1 Experimental model of the test situations and procedures. After the initial contact, 92 subjects (63 + 29) were excluded because they did not meet the inclusion requirements. By the end of the study, after giving informed consent, 16 volunteers had performed all

experimental procedures. The parameters were evaluated during chronic exercise (before and after) and acute exercise (pre-exercise, post-exercise and after 30 min of rest following exercise)

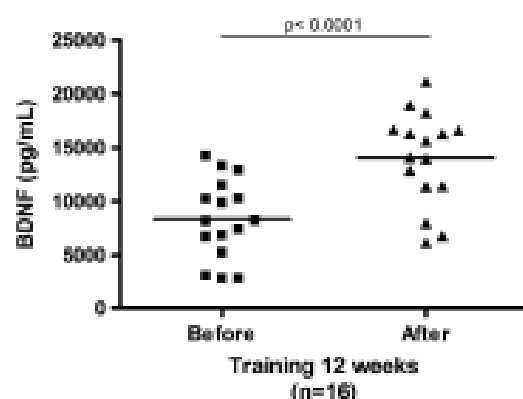


Fig. 3 Plasma concentrations of BDNF in elderly women with knee osteoarthritis ($n = 16$) before and after the 12-week training period. Statistical analysis was performed with Student's t test, and the p values are shown above

Interaction between acute and chronic effects

As suggested by Haaland et al. [19], we evaluated the interaction of different types of exercise, specifically, the alteration of the acute responses mediated by chronic training with 2 factors in an ANOVA. No interaction was found ($F = 2.747$, $p = 0.0695$).

We also measured the effect of training on the clinical parameters of the distance walked and the pain perceived (walk test 6 min and score of pain on the visual analogue scale, respectively), and the results are shown in Fig. 4. The volume of training significantly increased the 6-min walking distance and also reduced pain. However, these changes did not correlate with the changes in the concentrations of BDNF described above (data not shown).

Discussion

Acute exercise promotes a significant increase in the maximal workload in both male and female patients, and this result is associated with increasing BDNF plasma concentrations [20]. In humans, the BDNF response to

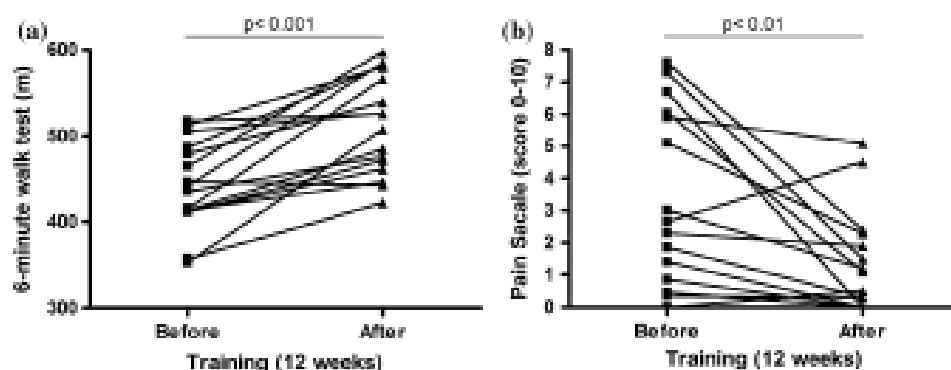
exercise differs depending on the type and intensity of exercise. In his 2010 review [21], Kristel Kraepen found that independently of the exercise intensity, BDNF concentrations generally returned to baseline within 15–60 min and tended to decrease to below baseline levels after 60 min. Other studies have shown changes in circulating concentrations of BDNF in healthy individuals performing different types and intensity levels of exercise [11, 22]. Recently, Cho et al. [22] showed that basal BDNF levels are inversely correlated with cardiorespiratory fitness levels in a population of young students; however, the result was a positive correlation immediately after the exercise. Furthermore, a study of Brazilian sprinters demonstrated that increased basal BDNF plasma concentrations were related to enhanced exercise performance [11].

Despite these findings and the growing interest in the study of BDNF plasma levels in special populations during acute and chronic exercise, there are few studies that have investigated the effect of exercise on this cytokine in individuals with disease [21]. A recent study of elderly women with different frailty phenotypes demonstrated that there were higher plasma concentrations of BDNF in nonfrail compared to pre-frail elderly women [14]. Moreover, physical therapy intervention was shown to increase the plasma BDNF levels in frail elderly women.

The association of low levels of BDNF with ageing and several diseases (neurologic [23], psychiatric [20], frailty syndrome [14] and cognitive function [24]) and the elevation of BDNF concentrations following intervention (physical therapy [14] and physical activity [11]) suggest that this mediator may be an important regulatory factor in the elderly population. This supposition is supported by the results presented here, demonstrating an increase in BDNF plasma concentrations after acute and chronic exercise as well as an improvement in the clinical parameters of elderly women with knee OA.

Due to the incipient studies regarding BDNF plasma concentrations and inflammatory diseases, the possibility remains that BDNF plasma levels are not related to OA but are instead associated with chronic inflammatory

Fig. 4 Values of functional variables and the effect of training on the walking distance (a) and pain score on the visual analogue scale (b) in the 6-min walk test. Statistical analysis was performed with Student's t test, and the p values are shown above



conditions resulting from ageing [25]. However, even in the light of this possibility, the present pilot study brings novel data to this discussion.

The limitations of this study should be considered when interpreting the results. Although the sample size was relatively small, significant differences were found with acute exercise and training. With a larger sample size, a correlation between the clinical and functional parameters of patients with knee OA and BDNF levels may have been established. Further limitations include the absence of an acute exercise group and reliable parameters for basal concentrations of BDNF. It remains to be determined whether basal BDNF concentrations differ among patients with arthritic diseases.

Conclusion

The results show that (1) acute exercise (20 min on a treadmill) increases the BDNF plasma concentrations compared to the resting concentrations and these increased levels persist for up to 30 min into the recovery phase and (2) the aerobic training programme effectively augments the BDNF plasma concentrations and improves clinical parameters in this population.

Acknowledgments This study was supported by grant of: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). The assistance of Brazilian Society of Physiology is gratefully acknowledged.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Nguyen US, Zhang Y, Zhu Y, Niu J, Zhang B, Felson DT (2011) Increasing prevalence of knee pain and symptomatic knee osteoarthritis: survey and cohort data. *Ann Intern Med* 155(11):725–732. doi:10.1093/0003-4819-155-11-20111260-00004
2. Marel-Pelletier J (2004) Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12(Suppl A):S31–S33
3. Goldring MB, Otero M (2011) Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 23(5):471–478. doi:10.1097/BOB.0b013e328349c2b1
4. Haseeb A, Haqqi TM (2013) Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clin Immunol* 146(3):185–196. doi:10.1016/j.clim.2012.12.011
5. Wu Q, Henry JL (2012) Functional changes in muscle afferent neurons in an osteoarthritis model: implications for impaired proprioceptive performance. *PLoS ONE* 7(5):e36854. doi:10.1371/journal.pone.0036854
6. Peixoto JG, Dias JM, Dias RC, da Fonseca ST, Teixeira-Salmela LP (2011) Relationships between measures of muscular performance, proprioceptive acuity, and aging in elderly women with knee osteoarthritis. *Arch Gerontol Geriatr* 53(2):e253–e257. doi:10.1016/j.archger.2011.05.008
7. Binder DK (2004) The role of BDNF in epilepsy and other diseases of the mature nervous system. *Adv Exp Med Biol* 548:34–56
8. Yamamoto H, Gurney ME (1990) Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 10(11):3469–3478
9. Lindsay RM (1994) Neurotrophic growth factors and neurodegenerative diseases: therapeutic potential of the neurotrophins and ciliary neurotrophic factor. *Neurobiol Aging* 15(2):249–251
10. Makar TK, Tisler D, Sun KT, Sultana S, Patel N, Bever CT (2008) Brain derived neurotrophic factor treatment reduces inflammation and apoptosis in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 270(1–2):70–76. doi:10.1016/j.jns.2008.02.011
11. Correia PR, Scorza FA, Gomes da Silva S, Passani A, Toscano-Silva M, de Almeida AC, Arida RM (2011) Increased basal plasma brain-derived neurotrophic factor levels in sprint runners. *Neurosci Bull* 27(5):325–329
12. Pedersen BK (2011) Exercise-induced myokines and their role in chronic diseases. *Brain Behav Immun* 25(5):811–816. doi:10.1016/j.bbi.2011.02.010
13. Zoladz JA, Pilc A, Majerczak J, Grandys M, Zapart-Bukowska J, Duda K (2008) Endurance training increases plasma brain-derived neurotrophic factor concentration in young healthy men. *J Physiol Pharmacol* 59(Suppl 7):119–132
14. Coelho FM, Pereira DS, Lustosa LP, Silva JP, Dias JM, Dias RC, Queiroz BZ, Teixeira AL, Teixeira MM, Pereira LS (2011) Physical therapy intervention (PTI) increases plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in non-frail and pre-frail elderly women. *Arch Gerontol Geriatr*. doi:10.1016/j.archger.2011.05.014
15. Pereira DS, Zile de Queiroz B, Miranda AS, Rocha NP, Felício DC, Mateo EC, Pavoni M, Coelho FM, Jesus-Moraes P, Gomes Pereira DA, Teixeira AL, Máximo Pereira LS (2013) Effects of physical exercise on plasma levels of brain-derived neurotrophic factor and depressive symptoms in elderly women - a randomized clinical trial. *Arch Phys Med Rehabil*. doi:10.1016/j.apmr.2013.03.029
16. Price DD, McGrath PA, Rafii A, Buckingham B (1983) The validation of visual analogue scales as ratio scale measures for chronic and experimental pain. *Pain* 17(1):45–56
17. Pires S, Oliveira A, Paisem V, Brito R (2007) Six-minute walk test at different ages and body mass indexes. *Rev Bras Fisioter* 11:147–151
18. Chen MJ, Fan X, Moe ST (2002) Criterion-related validity of the Borg ratings of perceived exertion scale in healthy individuals: a meta-analysis. *J Sports Sci* 20(11):873–899
19. Haaland DA, Sabljic TF, Basilean DA, Mukovozov IM, Hart LE (2008) Is regular exercise a friend or foe of the aging immune system? A systematic review. *Clin J Sport Med* 18(6):539–548. doi:10.1097/JSM.0b013e3281818f6e
20. Gustafsson G, Lin CM, Johansson J, Wisen A, Wohlfart B, Erman R, Westrin A (2009) The acute response of plasma brain-derived neurotrophic factor as a result of exercise in major depressive disorder. *Psychiatry Res* 169(3):244–248. doi:10.1016/j.psychres.2008.06.030
21. Knaepen K, Goekint M, Heyman EM, Meusen R (2010) Neuroplasticity—exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: a systematic review of experimental studies in human subjects. *Sports Med* 40(9):765–801. doi:10.2165/11314530-000000000-00000
22. Cho HC, Kim J, Kim S, Son YH, Lee N, Jung SH (2012) The concentrations of serum, plasma and platelet BDNF are all increased by treadmill VO(2max) performance in healthy college men. *Neurosci Lett*. doi:10.1016/j.neulet.2012.05.025

23. Schubitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A, Kuhn HG (2007) Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke* 38(7):2165–2172. doi:10.1161/STROKEAHA.106.477331
24. Komulainen P, Pedersen M, Hanninen T, Bruusgaard H, Lakka TA, Kivipelto M, Hassinen M, Rauramaa TH, Pedersen BK, Rauramaa R (2008) BDNF is a novel marker of cognitive function in ageing women: the DR's EXTRA Study. *Neurobiol Learn Mem* 90(4):596–603. doi:10.1016/j.nlm.2008.07.014
25. Vasto S, Candore G, Balistrieri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Giamaldi MP, Listi F, Nuzzo D, Lio D, Caruso C (2007) Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev* 128(1):83–91. doi:10.1016/j.mad.2006.11.015

Apêndice 3

Aerobic training modulates T cells activation in aged with knee osteoarthritis.

AGE

Aerobic training modulates T cells activation in aged with knee osteoarthritis

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Aerobic training modulates T cells activation in aged with knee osteoarthritis
Article Type:	Short Communication
Keywords:	Osteoarthritis; Aged; Exercise; CD4-Positive T-Lymphocytes; CD8-Positive T-Lymphocytes
Corresponding Author:	Wellington Fabiano Gomes, PhD Student Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys (UFVJM) Diamantina, MG - Minas Gerais BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys (UFVJM)
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Wellington Fabiano Gomes, PhD Student
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Wellington Fabiano Gomes, PhD Student Ana Cristina Rodrigues Lacerda, PhD Gustavo Eustáquio Alvim Brito-Melo, PhD Suelli Ferreira Fonseca, PhD Student Etel Vieira-Rocha, PhD Amanda Aparecida Oliveira Leopoldino, PhD Student Mateus Ramos Amorim, PhD Student Vanessa Amaral Mendonça, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>Purpose: Osteoarthritis of the knee (kOA) is a disease that mainly affects the elderly and can lead to major physical and functional limitations. However, the specific effects of walking, particularly on the immune system, are unknown. Therefore, this study aimed to analyze the effect of 12 weeks of walking (3x/week) on the leukocyte profile and quality of life (QV) of elderly women with kOA. Methods: Sixteen women (age: 67 \pm 4 years, body mass index: 28.07 \pm 4.16 kg/m²) participated in a walking program. The variables were assessed before and after 12 weeks of training with a progressively longer duration (30-55 min) and higher intensity (72-82% of HRmax determined using a graded incremental treadmill test). The QV was assessed using The Medical Outcomes Study 36-Item Short Form Health Survey (SF-36), and blood samples were collected for analysis with a cell counter and the San Fac flow cytometer. Results: Walking training resulted in a 47% enhancement of the self-reported quality of life ($p < 0.05$) and a 21% increase in the VO₂max ($p < 0.0001$) in elderly women with kOA. Furthermore, there was a reduction in CD4+ cells (before 46.69\pm7%, after 44.68\pm9%, $p=0.0189$) and a higher fluorescence intensity for CD18+CD4+ (before 45.30 \pm 10, after 64.27 \pm 33, $p=0.0266$) and CD18+CD8+ (before: 64.2 \pm 27, after 86.02 \pm 36, $p=0.0130$). Conclusions: The walking program stimulated leukocyte production, and this outcome may be related to the immunomodulatory effect of exercise. Walking led to improvements in the QV and physical performance in elderly women with kOA.</p>

Aerobic training modulates T cells activation in aged with knee osteoarthritis

Wellington Fabiano Gomes¹, Ana Cristina Rodrigues Lacerda¹, Gustavo Eustáquio Alvim Brito-Melo¹, Sueli Ferreira Fonseca¹, Etel Rocha-Vieira¹, Amanda Aparecida Oliveira Leopoldino², Mateus Ramos Amorim³, Vanessa Amaral Mendonça¹.

¹ Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys (UFVJM), Diamantina, Minas Gerais, Brazil.

² Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

³ University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Address correspondence to Wellington F. Gomes, UFVJM - Physical Therapy Department. Highway MGT 367 - Km 583, nº 5000 - Alto da Jacuba. Diamantina, Minas Gerais, Brazil. Phone: +55 (038) 35321200; Fax: +55 (038) 35326000;

E-mail address: wellingtonufvjm@gmail.com

Abstract

Purpose: Osteoarthritis of the knee (kOA) is a disease that mainly affects the elderly and can lead to major physical and functional limitations. However, the specific effects of walking, particularly on the immune system, are unknown. Therefore, this study aimed to analyze the effect of 12 weeks of walking (3x/week) on the leukocyte profile and quality of life (QV) of elderly women with kOA. **Methods:** Sixteen women (age: 67 ± 4 years, body mass index: 28.07 ± 4.16 kg/m²) participated in a walking program. The variables were assessed before and after 12 weeks of training with a progressively longer duration (30-55 min) and higher intensity (72-82% of HR_{max} determined using a graded incremental treadmill test). The QV was assessed using The Medical Outcomes Study 36-Item Short Form Health Survey (SF-36), and blood samples were collected for analysis with a cell counter and the San Fac flow cytometer. **Results:** Walking training resulted in a 47% enhancement of the self-reported quality of life ($p < 0.05$) and a 21% increase in the VO_{2max} ($p < 0.0001$) in elderly women with kOA. Furthermore, there was a reduction in CD4+ cells (before $46.59 \pm 7\%$, after $44.58 \pm 9\%$, $p = 0.0189$) and a higher fluorescence intensity for CD18+CD4+ (before 45.30 ± 10 , after 64.27 ± 33 , $p = 0.0256$) and CD18+CD8+ (before: 64.2 ± 27 , after 85.02 ± 35 , $p = 0.0130$). **Conclusions:** The walking program stimulated leukocyte production, and this outcome may be related to the immunomodulatory effect of exercise. Walking led to improvements in the QV and physical performance in elderly women with kOA.

Keywords: Osteoarthritis; Aged; Exercise; CD4-Positive T-Lymphocytes; CD8-Positive T-Lymphocytes.

Introduction

Aging is an issue that demands increasing attention in the field of elderly care, specifically in women with knee osteoarthritis (kOA) (Felson 2006; Davidson et al. 2011). Previous studies indicate that the aging process is associated with an underlying chronic inflammatory state. This state is characterized by an approximately two- to four-fold increase in the plasma levels of inflammatory cytokines, as well as cell-specific activation and increased cell migration (Krabbe et al. 2004; Haseeb and Haqqi 2013). The mechanisms related to the increased production and release of cytokines and the activation and migration of cells involved in the inflammatory process remain to be elucidated. There are several factors that appear to be involved in inflammation, including the presence of chronic disease, decreased production of sex steroids, psychosocial factors and increased adipose tissue (Krabbe et al. 2004). The inflammatory changes associated with aging and kOA play an important role in the protein catabolism of muscle fibers, resulting in sarcopenia and, thus, functional changes that can be controlled by exercise (Lustosa et al. 2013).

Osteoarthritis is a chronic degenerative disease in which the knee is the most affected among the weight-bearing joints. This disease affects the main structures of the joint complex and may cause local pain and severe functional limitations, resulting in a declining quality of life in the elderly (Martel-pelletier 2004; Felson 2006; Arden and Nevitt 2006).

Therapeutic exercise (land- or water-based) is recommended for the effective management of osteoarthritis. Exercise has beneficial effects for relieving pain and improving function. Furthermore, it has few adverse effects and relatively low costs (Uthman and Windt 2013). Regular walking is often recommended for the elderly to the facility of implementation and the results obtained described in the literature (Haaland et al. 2008). Studies have shown that regular exercise of moderate intensity positively affects the immune system because of the associated anti-inflammatory effect (Walsh et al. 2011). Moreover, exercise induces immune-modulatory effects, such as changes in the number and function of peripheral blood cells (neutrophils, B, T, NK and monocytes), and it influences the trafficking of cells, such as CD8⁺ lymphocytes, between the blood and target tissues in healthy individuals (Witard et al. 2012).

The symptoms of kOA have a negative impact on health-related parameters in the elderly population, such as physical and functional performance and vitality as well as social, mental and emotional characteristics (Watanabe et al. 2010). Furthermore, considering the increase in the number of individuals with kOA and the need to understand the effects of exercise on the immune system in this population, it is clinically relevant to evaluate the effect of aerobic training (12 weeks, three times per week) on the quality of life in elderly women with kOA. Similarly, there is a need for an analysis of the balance of circulating leukocytes and immunological parameters related to activation and migration of subpopulations of T lymphocytes. It is believed that the anti-inflammatory effects of aerobic exercise (walking under conditions that are controlled and prescribed in accordance with the principles of load) are mediated by changes in the leukocyte profile in the peripheral blood of elderly women with kOA and that they have a positive influence on the perceived quality of life in this population.

Methods

Subjects

The study subjects consisted of elderly women from the city of Diamantina, Brazil, with clinically and radiographic diagnosed osteoarthritis (OA) of the knee. All patients met the inclusion criteria: (1) aged 65 years and over, (2) OA diagnosis in at least one knee based on the clinical and radiographic criteria of the American College of Rheumatology with radiographic classification, (3) no prior surgical procedure in the lower limbs, (4) no history of recent trauma to the knees, (5) no use of mobility aids (canes, crutches, and walkers), (6) no history of physical therapy or any other procedure for rehabilitation in the last 3 months, (7) met the clinical conditions and cognitive requirements for the exercises, (8) completion of the Mini-Mental State Examination (MMSE), and (9) no use of any immunosuppressive medication. Patients

unable to finish the test run that was used to determine the level of physical capability required to complete this study were removed. The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Vales do Jequitinhonha e Mucuri (101/09).

Procedures

Demographic data were collected after the inclusion criteria had been met. After providing informed consent, the patients were subjected to the maximal exercise test on a treadmill to determine their physical capacity for the required training in the study. One week later, the quality of life of the subjects was assessed using the Short Form-36 (SF-36) generic instrument. Additionally, 6 mL of blood was collected from each subject with heparin as an anticoagulant. All subjects were evaluated at the same time, and the biological samples were processed within 24 h after collection. The SF-36 and blood sample collection were repeated after 12 weeks of a walking training program.

Radiographic evaluation

To ensure that the participants had KOA and to reliably standardize the samples, a radiological evaluation was performed on all of the volunteers. Anteroposterior, oblique, and lateral images of the most affected knee were taken in the standing position. A radiological classification was made in accordance with the Kellgren–Lawrence (Kellgren and Lawrence 1957).

Training

Training consisted of walking with a progressive increase in the exercise load. This was performed three times per week on alternating days, for 12 weeks straight. Each volunteer wore a heart monitor with an audible alarm system calibrated to ensure that the target heart rate was achieved and maintained during the physical performance test for the duration of the training. The exercise consisted of three distinct stages: warm up (5 min), aerobic exercise–walking (initially 30 min, 70% HR_{max}), and cool down (5 min). The volume of aerobic exercise was individually prescribed and changed gradually in 5-min increments every 2 weeks (30 min in the first week and up to 55 min in the last week) with a similar progression for target heart rate training (72% HR_{max} 1st to 3rd week, 77% HR_{max} the 4th to 7th week, and 82% HR_{max} from 8th to 12th week) *_Figure 01_*.

Aerobic performance

To determine the aerobic capacity, a progressive exercise test was performed on a treadmill until the volunteers reached a state of fatigue, as determined by the heart rate (HR) or by a Borg rating on the perceived exertion scale (PES). The test was stopped and considered maximal if at least one of the following criteria was met: the volunteers reached a score of more than 18 on the Borg scale or volitional fatigue (modified Naughton protocol)(Naughton 1964).

Quality of life

To determine the perception of quality of life, the Short Form Health Survey (SF-36) was applied. The SF-36 is a multidimensional test that is composed of 36 items that are divided into physical and emotional components and evaluates eight of the main domains related to health. In each domain, the punctuation varied from 0 to 100. A higher score indicated a better quality of life. The SF-36 has been validated and adapted for the Brazilian culture.(Ciconelli, Rozana Mesquita; Ferraz, Marcos Bosi; Santos, Wilton; Meinão, Ivone; Quaresma 1999)

Cell parameters

Cell immunophenotyping was performed to evaluate the biological material. The results are expressed as percentage values for the cell balance analysis, and the mean fluorescence intensity (MFI) was used to analyze the relative density of receptor expression on the cell surface.

Fifty microliters of peripheral blood was incubated with fluorescently conjugated monoclonal antibodies against various cell surface markers, including CD3, CD4 and CD8, for the analysis of the subsets of T

lymphocytes, CD19 for the analysis of B lymphocytes, and CD16 for the analysis of NK and NKT cells. CD28 and HLA-DR were also evaluated because of their role in cell activation, and CD18, an integrin, was assessed because of its involvement in the migration process. Then, the erythrocytes were lysed (FACSLyse solution, BD, San Diego, USA), and the remaining cells were washed twice using saline solution. The data were acquired (10,000 events) on a FACScan flow cytometer, followed by data analysis using CellQuest software (both BD, San Diego, USA).

For the analysis of MFI, after selection of the population of interest (CD4-positive lymphocytes), the density of CD18 receptors on the cell surface was evaluated; the results are expressed as the mean fluorescence density.

Statistical analysis

The sample size was determined based on a pilot study with four subjects. From the data for the variable of interest, the sample size was calculated considering an alpha of 5% and a power of 80% for a sample composed of sixteen subjects.

Descriptive analysis and normality tests (Shapiro-Wilk) were performed using the statistical package GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). When the data were normally distributed, statistical analysis was performed using paired Student's t tests. The results were considered statistically significant at a significance level of 5%.

Results

The samples were evaluated from sixteen volunteers with a clinical and radiographic diagnosis of OA (*figure 2*). All subjects (mean age: 67 ± 4 years; mean body mass index: 27.8 ± 4 Kg/m²) completed the 12-week training program with an overall compliance rate of the 93.6%. The training program did not change the mean body mass index (27.1 ± 2 Kg/m²).

Physical performance was determined using the values obtained for maximum oxygen consumption (VO_{2max}) during the progressive tests to fatigue performed on a treadmill before and after training. The VO_{2max} (mL/kg/ min) increased by an average of 21% with training (mean before: 27.7 ± 5 , mean after 33.6 ± 5 and $p < 0.0001$).

In addition to improving the aerobic performance, the training affected certain leukocyte populations in the elderly women, resulting in a decrease in the percentages of circulating neutrophils and lymphocytes. The leukocyte counts are presented in *table 1*.

The data (*figure 3*) demonstrate that after 12 weeks of training (3x/week), there was no change in the percentage of CD8⁺ (*figure 3A*) (mean before: 26.1 ± 8 , mean after 24.5 ± 10 and $p = 0.1604$) or CD8⁺CD28⁺ (*figure 3B*) cells compared with before the intervention (mean before: 11.3 ± 3 , mean after 10.43 ± 3 and $p = 0.1227$). However, regarding the mean fluorescence intensity, there was an increase in CD18⁺CD8⁺ (*figure 3C*) (mean before: 64.2 ± 27 , mean after 85.02 ± 35 and $p = 0.0130$).

In contrast to the results for CD8⁺, we observed a reduction in the percentage of CD4⁺ cells after training compared with before the intervention (*figure 3D*) (mean before 46.59 ± 7 , mean after 44.58 ± 9 and $p = 0.0189$). However, similar to the results for CD8⁺ cells, the percentage of activated CD4⁺CD28⁺ leukocytes did not change with training (*figure 3E*) (mean before 40.42 ± 9 , mean after 37.90 ± 11 and $p = 0.0505$). There was an increase in the fluorescence intensity of CD18⁺CD4⁺ cells (*figure 3F*) (mean before 45.30 ± 10 , mean after 64.27 ± 33 and $p = 0.0256$).

The self-perceived quality of life was positively enhanced by 47% at the end of the 12-week intervention (*figure 4*), indicating improvement in all four of the physical components of the SF-36: physical function (72.50 ± 2 , $p < 0.01$, 50% increase), role physical (85.94 ± 3 , $p < 0.01$, 77% increase), bodily pain (64.19 ± 2 , $p < 0.01$, 62% increase), and general health (65.75 ± 2 , $p < 0.01$, 36% increase). The mental components also showed improvement: social function (74.22 ± 4 , $p < 0.05$, 30% increase), role emotional

(87.49 ± 6 , $p < 0.05$, 61% increase), mental health (79.75 ± 3 ; $p < 0.05$, 22% increase) and vitality (74.38 ± 2 , $p < 0.01$, 39% increase).

Discussion

The results of this study demonstrate that the proposed walking training increased physical performance, improved the self-rated quality of life and mobilized a distinct immune response in these elderly subjects with KOA. Specifically, we evaluated the change after training in the average percentages of the cell populations/subpopulations that are primarily associated with cell migration.

It has been suggested that the clinical course of osteoarthritis is influenced by mechanisms related to the effector function of T lymphocytes (Haseeb and Haqqi 2013). T lymphocytes are sub-classified into $CD4^+$ and $CD8^+$ cells and are affected by various factors such as the microenvironment. Stimulation by soluble and membrane-bound factors may direct the immune response mechanisms linked to the maintenance or resolution of the inflammatory response.

Given this complex network of interactions between cells and stimulation, T lymphocytes respond in diverse and sometimes antagonistic ways. For example, T lymphocytes, such as Th1 ($CD3^+CD4^+TNF^+$), Th17 ($CD3^+CD4^+IL-17^+$) and cytotoxic T lymphocytes ($CD3^+CD8^+$), can intensify the inflammatory response. However, they can also reduce the inflammatory response, as in the case of T suppressors ($CD3^+CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$) and Treg lymphocytes ($CD3^+CD8^+$). The mechanisms related to how and when these elements function, particularly in the immune system of older individuals, are the subjects of ongoing investigations. (Baylis et al. 2013)

Clinical studies over time have shown that the immune system responds to increased physical activity. The effects of intense exercise on the immune response differ from those observed during moderate-intensity exercise; individuals participating in frequent high-intensity exercise appear to be more immunocompromised than those who perform exercise of moderate physical intensity. In context, it has been proposed that the intensity of exercise influences the subpopulations of Th17 and Treg cells. The Th17 T-helper lymphocytes are $CD4^+$ T lymphocytes that produce IL-17, a cytokine that plays a crucial role in the allergic inflammatory process, and are known as a potent pro-inflammatory cell type in autoimmune chronic-degenerative diseases (Walsh et al. 2011). $CD4^+CD25^+$ cells are regulatory T-lymphocytes that are differentiated and actively involved in the control of the peripheral immune response. Treg cells originate from precursor $CD4^+CD25^-$ lymphocytes, which when stimulated by TGF- β and IL-2, signal the expression of FOXP3 to maintain the regulatory function of Treg cells. The involvement of $CD8^+$ T lymphocytes ($CD3^+CD8^+CD45^{low}$) in immunosuppressive mechanisms have also been reported; however, the regulatory mechanisms of this cell population remain unknown. (Sakaguchi et al. 2009)

The present study demonstrated that physical exercise in elderly individuals with knee osteoarthritis promoted a significant improvement in function and quality of life in these patients. A comparison of before and after training demonstrated a decrease in peripheral blood lymphocytes, and analysis of the expression of the cell adhesion marker CD18 revealed an increase in the $CD4^+$ and $CD8^+$ subpopulations. CD18 is an integrin that is expressed by activated T lymphocytes in an antigen-specific manner and replaces the selectin receptor that is constitutively found in virgin cells that are restricted to secondary lymphoid organs. Thus, increased expression of this molecule could suggest a potential increase in the migration of subpopulations of T lymphocytes, mainly $CD4^+$ T lymphocytes, toward the site of inflammatory lesions, as indicated by the decline in the percentage of $CD4^+$ T lymphocytes in the peripheral blood of patients. Yeh (2013) have demonstrated that people undergoing a regular 12-week program of music aerobic exercise (MAE) at a moderate level of physical activity present changes in leukocyte distribution, lymphocyte subsets, and lymphocyte polarization. The participants also exhibited an increase in the frequency of $CD4^+CD25^+$ T cells associated with Treg polarization, and they presented enhanced FoxP3 expression, but not T-bet, Gata-3 or ROR γ T expression ($p < 0.01$). These results raised the hypothesis that physical exercise of moderate intensity, such as that described here, could have provided immunosuppression characterized by the migration of Treg ($CD4^+$) cells. These cells may be able to influence the immune status of the patient and provide control of local inflammation, consequently resulting in clinical improvement.

The probable lymphocytopenia observed in the present study occurred only in the CD4⁺ subpopulation, and there was no change in CD8⁺ cells. Witard ¹¹ observed a reduction in CD8⁺ cells in response to intense exercise, demonstrating that the lymphocyte profile is highly sensitive to exercise and is largely driven by CD8⁺ T cells. The discrepancies between these studies may be due to the fact that Witard et al. studied a different population (young adults) and examined the acute effect of exercise. Recently, Brown and colleagues (Brown et al. 2013) highlighted the importance of the variables of sex and training status for the redistribution of senescent and naive T lymphocytes in response to exercise. Therefore, comparisons of the studies are limited because of differences in the characteristics of the samples. Moreover, Pereira et al. (2011) demonstrated that the apoptosis and migration of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes remain elevated 24 h after acute resistance training and that the cell count presented no immediate change at 2 or 24 h after exercise. CD8⁺ lymphocytes presented a higher responsiveness than CD4⁺ to a session of exercise with regard to apoptosis and migration, and the rest-interval exerted minimal effects. However, the sample was composed of twelve healthy, untrained, young individuals (mean age, 20.7 years), and the study focused on the effects of acute resistance training (Pereira et al. 2012).

A possible explanation for the observation of lymphocytopenia after aerobic exercise is the movement of cells from the circulation (migration) and, most likely, from the involved joint. However, this hypothesis was not evaluated in the present study. Cells migrate to and from the lymphoid pools to maintain the homeostasis of immunity (Pereira et al. 2012), and they migrate to and from inflamed joints to control the local inflammatory process.

It is also important to emphasize the specificity of the sample of this study, which was composed of older women with a joint disease. Studies have been conducted to determine the effect of a single session of exercise and of a training program, but some authors suggest that there is no interaction between acute exercise and training in the elderly (Fahlman et al. 2000). This phenomenon remains unclear in the studies specifically examining the effect of acute stress in the elderly population, and some studies have shown no changes in the recruitment of this subpopulation. Thus, adaptations resulting from training cannot be accounted for by the sum of the results of each exercise session.

Another novel feature of this study was the pattern of CD18 expression on the surface of T lymphocytes (CD8⁺ and CD4⁺), as certain T-cell subsets were more likely to migrate. This result was demonstrated by the increase in the fluorescence intensity of both the CD8⁺ and CD4⁺ cell populations. The study by Pereira et al. (Pereira et al. 2012) was the only study to examine fluorescence intensity after acute exercise. Similar to their study, the exercise training program described in this report activated more cells that may be related to the immune system's role in regaining control of the low-grade inflammation that is chronically observed in kOA. Moreover, as recently described, these active cell populations are more likely to exert a modulatory effect on inflammation and function to maintain the relative number of T cells (Zhao et al. 2012). This capacity for the local modulation of inflammation may be associated with increased membrane expression of markers involved in adhesion to vessels and, therefore, greater migration to the target tissue.

Dorshkind et al. (2009) (Dorshkind et al. 2009) reported the lower expression of CD28 on the surface of certain immune cells during the process of immunosenescence caused by an inappropriate immune response, such as in the case of the reaction to vaccination. Thus, aerobic exercise training could promote an increase in percentage of CD8 T helper cells, resulting in a lower risk of infection and inflammation. In subjects with kOA, these changes in the immune response were not observed; however, it is important to emphasize that the positive immunomodulatory effect may be related to the magnitude of activation because there was improvement in all of the clinical and functional parameters of the subjects after an aerobic training program.

It is worth noting that the present study sample was characterized as overweight, and after the intervention period, there was no change in body mass index. Because the load of bodyweight on the affected limb remained similar throughout the study, it is believed that the improvement in several domains of quality of life as well as the immunological changes were related to the training program and not the reduction of the weight overload on the affected limb. Another possibility to explain this positive effect on the self-perceived quality of life and immune parameters could be that the exercise training directly affected the adipose tissue, which has immunological effects.

In conclusion, the results of the present study demonstrated that a walking training program (three times a week for 12 weeks) with a progressive and controlled load provided a significant improvement in all

evaluated aspects of quality of life and in the physical performance of elderly women with osteoarthritis of the knee. Furthermore, this intervention also resulted in the trafficking and activation of leukocytes, which may be related to the immunomodulatory effect. Therefore, this study provides new insights showing that a simple training protocol composed of walking is sufficient to activate immune markers of activated lymphocytes. Future studies should be designed to investigate the specific mechanism, including joint analyses.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Brazilian Society of Physiology and Santa Casa de Caridade Hospital of Diamantina. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Arden N, Nevitt MC (2006) Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20:3–25. doi: 10.1016/j.berh.2005.09.007
- Baylis D, Bartlett DB, Patel HP, Roberts HC (2013) Understanding how we age: insights into inflammaging. *Longev Heal* 2:8. doi: 10.1186/2046-2395-2-8
- Brown FF, Bigley AB, Sherry C, et al. (2013) Training status and sex influence on senescent T-lymphocyte redistribution in response to acute maximal exercise. *Brain Behav Immun*. doi: 10.1016/j.bbi.2013.10.031
- Ciconelli, Rozana Mesquita; Ferraz, Marcos Bosi; Santos, Wilton; Meinão, Ivone; Quaresma MR (1999) Brazilian-Portuguese version of the SF-36 questionnaire: A reliable and valid quality of life outcome measure. *Rev Bras Reumatol* 39:143–150.
- Davidson PM, Digiacomio M, McGrath SJ (2011) The feminization of aging: how will this impact on health outcomes and services? *Health Care Women Int* 32:1031–45. doi: 10.1080/07399332.2011.610539
- Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E, Signer R a J (2009) The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol* 9:57–62. doi: 10.1038/nri2471
- Fahlman M, Boardley D, Flynn MG, et al. (2000) Effects of endurance training on selected parameters of immune function in elderly women. *Gerontology* 46:97–104. doi: 22142
- Felson DT (2006) Osteoarthritis of the Knee. *N Engl J Med* 354:841–848. doi: 10.1056/NEJMcp051726
- Haaland D a, Sabljic TF, Baribeau D a, et al. (2008) Is regular exercise a friend or foe of the aging immune system? A systematic review. *Clin J Sport Med* 18:539–48. doi: 10.1097/JSM.0b013e3181865eec
- Haseeb A, Haqqi TM (2013) Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clin Immunol* 146:185–96. doi: 10.1016/j.clim.2012.12.011
- Kellegren J, Lawrence J (1957) Radiological assessment of osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis* 16:494–502.

- Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H (2004) Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol* 39:687–99. doi: 10.1016/j.exger.2004.01.009
- Lustosa LP, Máximo Pereira LS, Coelho FM, et al. (2013) Impact of an exercise program on muscular and functional performance and plasma levels of interleukin 6 and soluble receptor tumor necrosis factor in prefrail community-dwelling older women: a randomized controlled trial. *Arch Phys Med Rehabil* 94:660–6. doi: 10.1016/j.apmr.2012.11.013
- Martel-pelletier J (2004) Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12:31–33. doi: 10.1016/j.joca.2003.10.002
- Naughton J (1964) Refinements in method of evaluation and physical conditioning Conditioning Before and After myocardial Infarction. *Am J Cardiol* 14:837–843.
- Pereira GB, Prestes J, Tibana R a, et al. (2012) Acute resistance training affects cell surface markers for apoptosis and migration in CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes. *Cell Immunol* 279:134–9. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.11.002
- Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, et al. (2009) Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 21:1105–11. doi: 10.1093/intimm/dxp095
- Uthman O, Windt D van der (2013) Exercise for lower limb osteoarthritis: systematic review incorporating trial sequential analysis and network meta-analysis. *BMJ Br Med Journal* 347:1–13. doi: 10.1136/bmj.f5555
- Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, et al. (2011) Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev* 17:6–63.
- Watanabe H, Urabe K, Takahira N, et al. (2010) Quality of life, knee function, and physical activity in Japanese elderly women with early-stage knee osteoarthritis. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 18:31–4.
- Witard OC, Turner JE, Jackman SR, et al. (2012) High-intensity training reduces CD8⁺ T-cell redistribution in response to exercise. *Med Sci Sports Exerc* 44:1689–97. doi: 10.1249/MSS.0b013e318257d2db
- Zhao G, Zhou S, Davie A, Su Q (2012) Effects of moderate and high intensity exercise on T1/T2 balance. *Exerc Immunol Rev* 18:98–114.

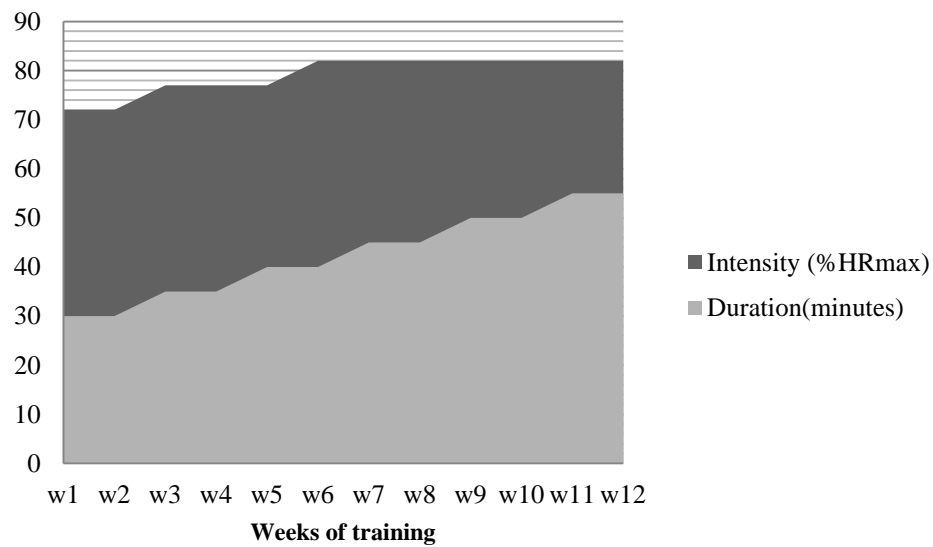


FIGURE 1. *Training program_* three times per week, 12 weeks (w-week), controlled in time (durations minutes) and intensity (monitored based on the target heart rate of each volunteer with a gradual progression of maximum heart rate - HR_{max}).

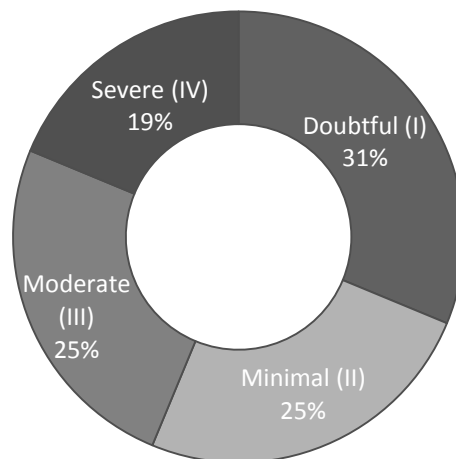


FIGURE 2. *Osteoarthritis Classification_* Knee osteoarthritis x-ray classification according to Kellgren and Lawrence_I to V degrees (n= 16).

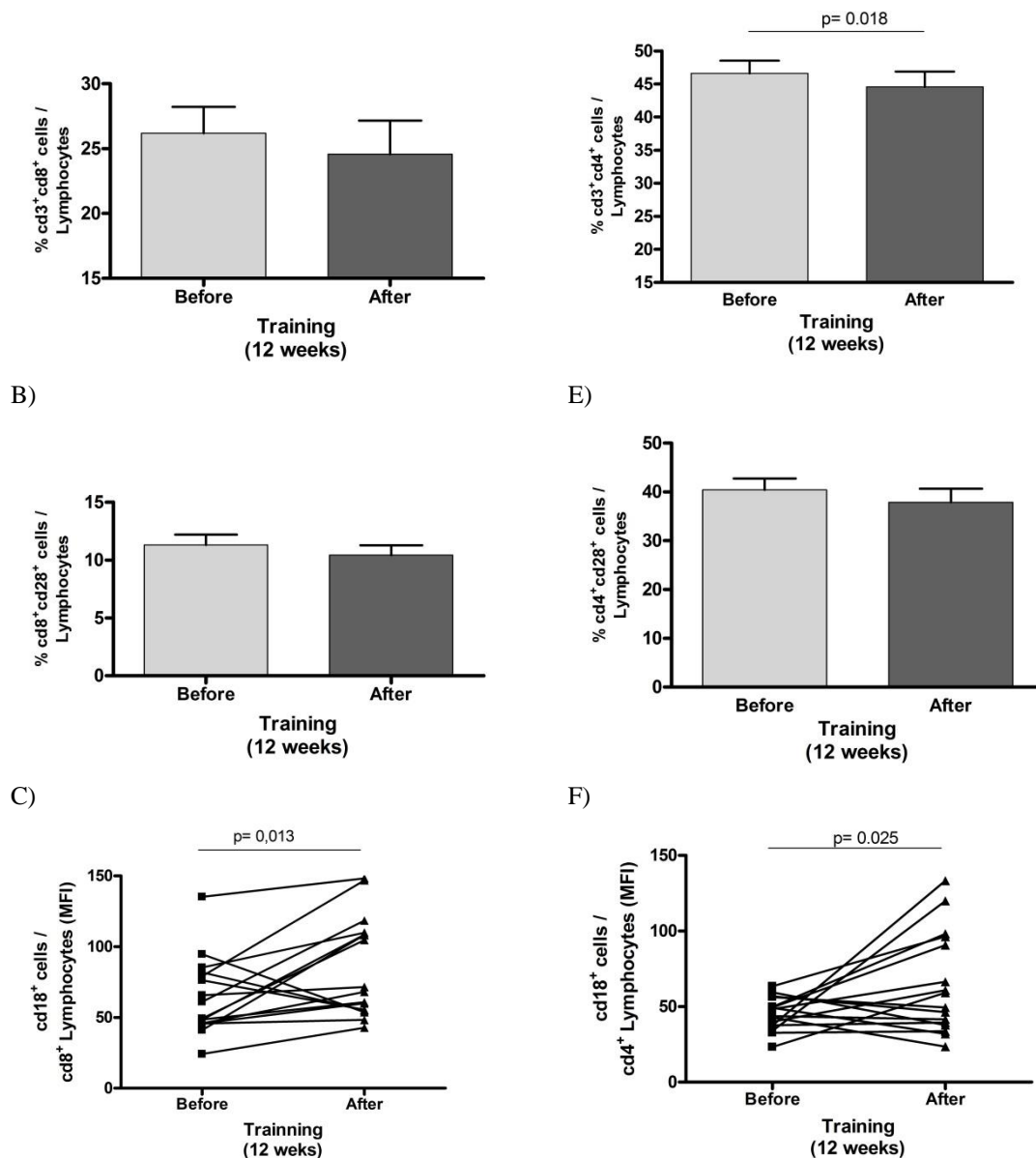


FIGURE 3. Phenotypic analysis of circulating leukocytes in peripheral blood of patients. Analysis of the percentage of subpopulations of TCD8+ cells (A) and TCD4+ cells-B lymphocytes (D) and the state of cell activation in CD8+ and CD4+ T cells by analysis of co-marking co-stimulatory molecule CD28 (B and E respectively). The analysis of the expression of CD18 on the cell surface integrin before and after training is shown in C (CD8+ T lymphocytes) and F (CD4+ T lymphocytes) to lymphocytes. Statistical analysis was performed with Student's t test, and the p-values are shown above.

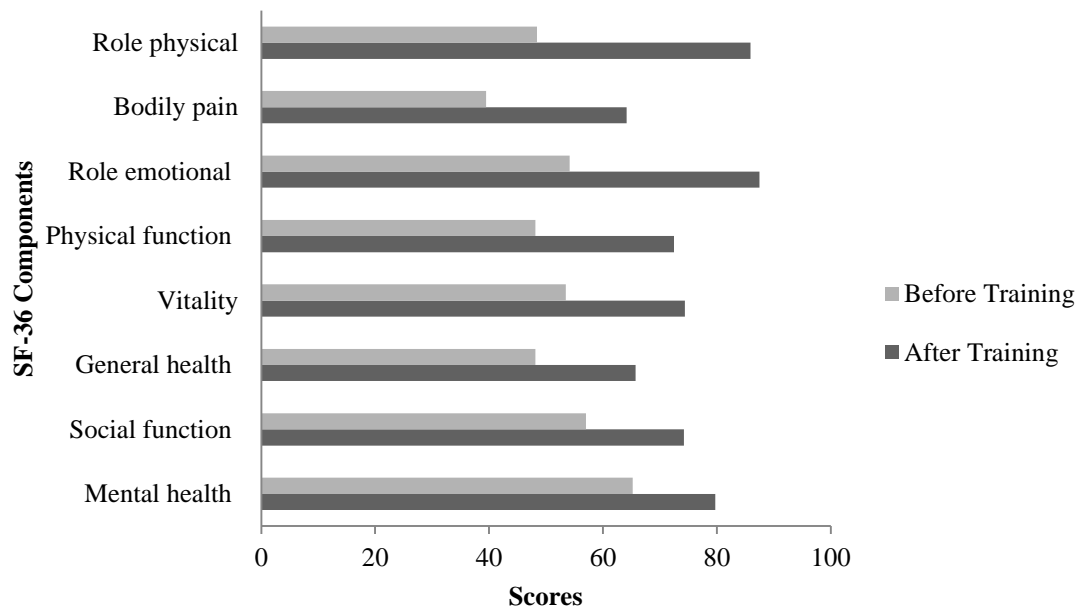


FIGURE 4. *Quality of life_* Scores of perception of quality of life, Short Form Health Survey (*SF-36*), before and after training. In each domain, the score varied from 0 to 100.

Table 1. Cells counts of the plasma of elderly women with knee osteoarthritis before and after 12-week aerobic training.

	Before				After				p
	Mean	95% CI		SD	Mean	95% CI		SD	
		Lower	Upper			Lower	Upper		
Leucocytes (cells/mm ³)	7948	6056	6859	3539	6025	5257	6793	1441	0.06
Lymphocytes (%)	39	32	45	12	37	31	43	11	0.01*
Monocytes (%)	04	03	05	01	03	01	04	03	0.27
Neutrophilis (%)	53	47	60	12	56	51	61	08	0.03*

*p<0.05; CI: confidence interval; SD: standard deviation



AMERICAN JOURNAL EXPERTS

EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

Manuscript title:

Aerobic training modulates T cells activation in aged with knee osteoarthritis

Authors:

Wellington Fabiano Gomes, Ana Cristina Rodrigues Lacerda, Sueli Ferreira da Fonseca, Mateus Ramos Amorim, Etel Rocha-Vieira, Amanda Aparecida Oliveira Leopoldino, Gustavo Eustáquio Alvim Brito-Melo, Vanessa Amaral Mendonça.

Date Issued:

August 13, 2014

Certificate Verification Key:

BD28-FD31-10D5-F104-36AA



This certificate may be verified at www.aje.com/certificate. This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at support@aje.com.

American Journal Experts provides a range of editing, translation and manuscript services for researchers around the world. Our top-quality PhD editors are all native English speakers from America's top universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. For more information about our company, services and partner discounts, please visit www.aje.com.

Apêndice 4 – TCLE**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Autorização de Consentimento Livre e Esclarecido (de acordo com o item IV da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde).

O Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) desenvolve uma pesquisa que consiste em avaliar o efeito de um programa de caminhada em idosos com osteoartrite de joelho.

No presente estudo o programa de treinamento consistirá em caminhada, 3 vezes por semana, durante 12 semanas.

Todos os protocolos de intervenção e avaliação serão realizados por acadêmicos previamente treinados sob orientação da professora Ana Cristina Lacerda. O estudo será realizado na Clínica Escola de Fisioterapia da UFVJM localizada na BR-367, km-583, nº 5000 e no pronto-socorro da Santa Casa de Caridade.

Após receber todas as informações sobre os procedimentos e objetivos da pesquisa que será realizada, dou pleno consentimento aos pesquisadores a realizar questionários, testes e intervenções necessários a essa pesquisa.

Tenho pleno conhecimento dos procedimentos aos quais posso ser submetido (a), assim como todos os riscos iminentes a eles, e que não haverá nenhum tipo de ônus ou bônus à minha pessoa. Tenho ainda a liberdade de me recusar a participar ou retirar-me em qualquer fase da pesquisa, sem penalização e prejuízo, tenho assegurado a garantia de sigilo e privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa, além de não haver nenhuma forma de indenização ou ressarcimento das despesas decorrentes da participação na pesquisa.

Dou pleno direito de retenção, uso na elaboração da pesquisa e de divulgação em congressos, publicação, trabalho de conclusão de curso e outros eventos científicos e acadêmicos dos dados obtidos, respeitando os respectivos códigos de ética.

Li ou me foi lido este termo, compreendi e concordo em participar do projeto desde que mantido sigilo quanto a minha identificação, mantendo essa informação como confidencial.

Nome do coordenador: Ana Cristina Lacerda

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e do Mucuri - UFVJM

Rua da Glória, 187. CEP 39100.000. Telefone para contato: 3531-0124

Apêndice 5 – Questionário clínico, sócio demográfico.

Examinador(a): _____

Data: __/__/__

Nome da voluntária: _____

Data de nascimento: __/__/__ Idade: _____ Cor: _____

Endereço: _____

Estado civil: () Solteiro () Casado () Viúvo () Divorciado () Outros

Responsável (grau de parentesco): _____

Tel: _____

Médico: _____ Tel: _____

Profissão ou ocupação atual: _____

Escolaridade:

() Analfabeto

() Ensino fundamental até 8º série

() Ensino médio – até 3º ano científico ou magistério

() Ensino superior

() Pós graduação

Diagnóstico clínico de osteoartrite de joelho? () Sim () Não

Se sim: () Unilateral () Bilateral

Joelho mais sintomático: () Direito () Esquerdo

Possui exame radiográfico do joelho? () Sim () Não

Sofreu trauma recente no joelho sintomático? () Sim () Não

Realizou tratamento fisioterapêutico nos últimos 3 meses? () Sim () Não

Passou por algum procedimento cirúrgico nos membros inferiores? () Sim () Não

Possui alguma dificuldade de deambulação/caminhar? () Sim () Não

Utiliza algum dispositivo de auxílio à marcha? () Sim () Não

Realiza algum tipo de atividade física regular (mais de 30 minutos três vezes por semana)? () Sim () Não

Medicamentos em uso:

Patologias associadas:

() Diabetes-glicose acima de 126 mg/dL

() Doenças respiratórias (asma, bronquite, sinusite, enfisema)

Outras: _____

() Doenças neuropsiquiátricas (AVE, depressão, doença de Parkinson)

Outras: _____

() Doenças cardiovasculares (hipotensão arterial, HAS, infarto arritmias, ICC)

Outras: _____

Doenças músculo-esqueléticas (reumatismo, artrite reumatóide, osteoartrite em outra articulação)

Outras: _____

() Neoplasias



() Incontinência urinária

() incontinência fecal

() Outras: _____

ANEXOS

Anexo 1 – Carta de Aprovação do CEP

	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI Comitê de Ética em Pesquisa/CEP	 UFVJM
Ofício nº. 101/09	Diamantina, 22 de maio de 2009.	
A Sua Senhoria, a Senhora Profª. Ana Cristina Rodrigues Lacerda Departamento de Fisioterapia-FCBS UFVJM		
Assunto: Parecer Consubstanciado Projeto 162/07		
Prezada Pesquisadora,		
<p>O projeto protocolado sob o registro provisório nº 162/07 e intitulado: "Efeito de um programa de caminhada subaquática comparado a um programa de caminhada fora da água em idosos com osteoartrite de joelho", foi reavaliado pelo CEP/UFVJM e recebeu o parecer APROVADO, tendo em vista que foram realizadas as alterações sugeridas por este Comitê, estando o projeto em conformidade com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Seu número de registro definitivo é 057/08.</p>		
<p>Trata-se de um estudo em que se verificará se há diferença no condicionamento aeróbico, na funcionalidade, na percepção da dor e rigidez na articulação do joelho e nos parâmetros imunológicos antes, durante e após um programa de caminhada subaquática, comparado a um programa de caminhada fora da água, em idosos portadores de osteoartrite.</p>		

Anexo 2 – Mini Exame do Estado Mental (MEEM)

Sugestões para uso do mini-exame do estado mental no Brasil

Bertollucci, Arq Neuropsiquiatr 1994; 52 : 1-7

Brucki et al., Arq Neuropsiquiatr 2003; 61 (3-B):777-781

Orientação temporal - pergunte ao indivíduo: (dê um ponto para cada resposta correta)

- *Que dia é hoje?*
- *Em que mês estamos?*
- *Em que ano estamos?*
- *Em que dia da semana estamos?*
- *Qual a hora aproximada?* (considere a variação de mais ou menos uma hora)

Orientação espacial - pergunte ao indivíduo: (dê um ponto para cada resposta correta)

- *Em que local nós estamos?* (consultório, dormitório, sala – apontando para o chão)
- *Que local é este aqui?* (apontando ao redor num sentido mais amplo: hospital, casa de repouso, própria casa).
- *Em que bairro nós estamos ou qual o nome de uma rua próxima?*
- *Em que cidade nós estamos?*
- *Em que Estado nós estamos?*

Memória imediata: *Eu vou dizer três palavras e você irá repeti-las a seguir: carro, vaso, tijolo* (dê 1 ponto para cada palavra repetida acertadamente na 1ª vez, embora possa repeti-las até três vezes para o aprendizado, se houver erros). Use palavras não relacionadas.

Cálculo: subtração de setes seriadamente (100-7, 93-7, 86-7, 79-7, 72-7, 65). Considere 1 ponto para cada resultado correto. Se houver erro, corrija-o e prossiga. Considere correto se o examinado espontaneamente se autocorrigir.

Evocação das palavras: pergunte quais as palavras que o sujeito acabara de repetir – 1 ponto para cada.

Nomeação: peça para o sujeito nomear os objetos mostrados (*relógio, caneta*) – 1 ponto para cada.

Repetição: Preste atenção: vou lhe dizer uma frase e quero que você repita depois de mim: *“Nem aqui, nem ali, nem lá.”*. Considere somente se a repetição for perfeita (1 ponto)

Comando: Pegue este papel com a mão direita (1 ponto), dobre-o ao meio (1 ponto) e coloque-o no chão (1 ponto). Total de 3 pontos. Se o sujeito pedir ajuda no meio da tarefa não dê dicas.

Leitura: mostre a frase escrita *“FECHE OS OLHOS”* e peça para o indivíduo fazer o que está sendo mandado. Não auxilie se pedir ajuda ou se só ler a frase sem realizar o comando (1 ponto).

Frase: Peça ao indivíduo para escrever uma frase. Se não compreender o significado, ajude com: alguma frase que tenha começo, meio e fim; alguma coisa que aconteceu hoje; alguma coisa que queira dizer. Para a correção não são considerados erros gramaticais ou ortográficos (1 ponto).

Cópia do desenho: mostre o modelo e peça para fazer o melhor possível. Considere apenas se houver 2 pentágonos interseccionados (10 ângulos) formando uma figura de quatro lados ou com dois ângulos (1 ponto)

MEEM

Voluntária: _____

Nº: _____
Máx. Pont.**Orientação temporal**

Que dia é hoje?

1

Em que mês estamos?

1

Em que ano estamos?

1

Em que dia da semana estamos?

1

Qual a hora aproximada?

1 **Orientação espacial**

Em que local nós estamos?

1

Que local é este aqui?

1

Em que bairro nós estamos ou qual o nome de uma rua próxima?

1

Em que cidade nós estamos?

1

Em que Estado nós estamos?

1 **Memória imediata**

Eu vou dizer três palavras e você irá repeti-las a seguir: carro, vaso, tijolo

3 **Cálculo**

Subtraia (100-7, 93-7, 86-7, 79-7, 72-7, 65)

5 **Evocação das palavras**

Quais as palavras que você acabou de repetir

3 **Nomeação**Qual é o nome desse objeto? (*relógio, caneta*)2 **Repetição**

Preste atenção: vou lhe dizer uma frase e quero que você repita depois de mim: "Nem aqui, nem ali, nem lá."

1 **Comando**

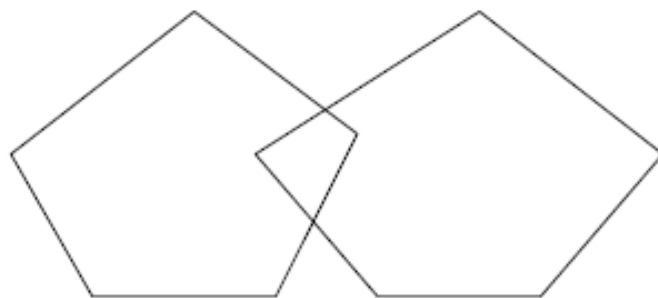
Pegue este papel com a mão direita, dobre-o ao meio e coloque-o no chão.

3 **Leitura****FECHE OS OLHOS**1 **Frase**

Escreva uma frase (que tenha começo, meio e fim)

1 **Cópia do desenho**

Copie este desenho o melhor possível (2 pentágonos interseccionados)

1 **TOTAL**30 

Feche os olhos

Anexo 3 – Questionário *Medical Outcomes Study 36 – Item Short-Form Health Survey* (SF-36)**Versão Brasileira do Questionário de Qualidade de Vida - SF-36**

1- Em geral você diria que sua saúde é:

Excelente	Muito Boa	Boa	Ruim	Muito Ruim
1	2	3	4	5

2- Comparada há um ano atrás, como você se classificaria sua idade em geral, agora?

Muito Melhor	Um Pouco Melhor	Quase a Mesma	Um Pouco Pior	Muito Pior
1	2	3	4	5

3- Os seguintes itens são sobre atividades que você poderia fazer atualmente durante um dia comum. Devido à sua saúde, você teria dificuldade para fazer estas atividades? Neste caso, quando?

Atividades	Sim, dificulta muito	Sim, dificulta um pouco	Não, não dificulta de modo algum
a) Atividades Rigorosas, que exigem muito esforço, tais como correr, levantar objetos pesados, participar em esportes árduos.	1	2	3
b) Atividades moderadas, tais como mover uma mesa, passar aspirador de pó, jogar bola, varrer a casa.	1	2	3
c) Levantar ou carregar mantimentos	1	2	3
d) Subir vários lances de escada	1	2	3
e) Subir um lance de escada	1	2	3
f) Curvar-se, ajoelhar-se ou dobrar-se	1	2	3
g) Andar mais de 1 quilômetro	1	2	3
h) Andar vários quarteirões	1	2	3
i) Andar um quarteirão	1	2	3
j) Tomar banho ou vestir-se	1	2	3

4- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou com alguma atividade regular, como consequência de sua saúde física?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Esteve limitado no seu tipo de trabalho ou a outras atividades.	1	2
d) Teve dificuldade de fazer seu trabalho ou outras atividades (p. ex. necessitou de um esforço extra).	1	2

5- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou outra atividade regular diária, como consequência de algum problema emocional (como se sentir deprimido ou ansioso)?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Não realizou ou fez qualquer das atividades com tanto cuidado como geralmente faz.	1	2

6- Durante as últimas 4 semanas, de que maneira sua saúde física ou problemas emocionais interferiram nas suas atividades sociais normais, em relação à família, amigos ou em grupo?

De forma nenhuma	Ligeiramente	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

7- Quanta dor no corpo você teve durante as últimas 4 semanas?

Nenhuma	Muito leve	Leve	Moderada	Grave	Muito grave
1	2	3	4	5	6

8- Durante as últimas 4 semanas, quanto a dor interferiu com seu trabalho normal (incluindo o trabalho dentro de casa)?

De maneira alguma	Um pouco	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

9- Estas questões são sobre como você se sente e como tudo tem acontecido com você durante as últimas 4 semanas. Para cada questão, por favor dê uma resposta que mais se aproxime de maneira como você se sente, em relação às últimas 4 semanas.

	Todo Tempo	A maior parte do tempo	Uma boa parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nunca
a) Quanto tempo você tem se sentindo cheio de vigor, de vontade, de força?	1	2	3	4	5	6
b) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa muito nervosa?	1	2	3	4	5	6
c) Quanto tempo você tem se sentido tão deprimido que nada pode anima-lo?	1	2	3	4	5	6
d) Quanto tempo você tem se sentido calmo ou tranqüilo?	1	2	3	4	5	6
e) Quanto tempo você tem se sentido com muita energia?	1	2	3	4	5	6
f) Quanto tempo você tem se sentido desanimado ou abatido?	1	2	3	4	5	6
g) Quanto tempo você tem se sentido esgotado?	1	2	3	4	5	6
h) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa feliz?	1	2	3	4	5	6
i) Quanto tempo você tem se sentido cansado?	1	2	3	4	5	6

10- Durante as últimas 4 semanas, quanto de seu tempo a sua saúde física ou problemas emocionais interferiram com as suas atividades sociais (como visitar amigos, parentes, etc)?

Todo Tempo	A maior parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nenhuma parte do tempo
1	2	3	4	5

11- O quanto verdadeiro ou falso é cada uma das afirmações para você?

	Definitivamente verdadeiro	A maioria das vezes verdadeiro	Não sei	A maioria das vezes falso	Definitivamente falso
a) Eu costumo obedecer um pouco mais facilmente que as outras pessoas	1	2	3	4	5
b) Eu sou tão saudável quanto qualquer pessoa que eu conheço	1	2	3	4	5
c) Eu acho que a minha saúde vai piorar	1	2	3	4	5
d) Minha saúde é excelente	1	2	3	4	5

CÁLCULO DOS ESCORES DO QUESTIONÁRIO DE QUALIDADE DE VIDA

Fase 1: Ponderação dos dados

Questão	Pontuação	
01	Se a resposta for	Pontuação
	1	5,0
	2	4,4
	3	3,4
	4	2,0
	5	1,0
02	Manter o mesmo valor	
03	Soma de todos os valores	
04	Soma de todos os valores	
05	Soma de todos os valores	
06	Se a resposta for	Pontuação
	1	5
	2	4
	3	3
	4	2
	5	1
07	Se a resposta for	Pontuação
	1	6,0
	2	5,4
	3	4,2
	4	3,1
	5	2,0
	6	1,0

08	<p>A resposta da questão 8 depende da nota da questão 7</p> <p>Se 7 = 1 e se 8 = 1, o valor da questão é (6)</p> <p>Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 1, o valor da questão é (5)</p> <p>Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 2, o valor da questão é (4)</p> <p>Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 3, o valor da questão é (3)</p> <p>Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 4, o valor da questão é (2)</p> <p>Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 3, o valor da questão é (1)</p> <p>Se a questão 7 não for respondida, o escore da questão 8 passa a ser o seguinte:</p> <p>Se a resposta for (1), a pontuação será (6)</p> <p>Se a resposta for (2), a pontuação será (4,75)</p> <p>Se a resposta for (3), a pontuação será (3,5)</p> <p>Se a resposta for (4), a pontuação será (2,25)</p> <p>Se a resposta for (5), a pontuação será (1,0)</p>
09	<p>Nesta questão, a pontuação para os itens a, d, e ,h, deverá seguir a seguinte orientação:</p> <p>Se a resposta for 1, o valor será (6)</p> <p>Se a resposta for 2, o valor será (5)</p> <p>Se a resposta for 3, o valor será (4)</p> <p>Se a resposta for 4, o valor será (3)</p> <p>Se a resposta for 5, o valor será (2)</p> <p>Se a resposta for 6, o valor será (1)</p> <p>Para os demais itens (b, c,f,g, i), o valor será mantido o mesmo</p>
10	Considerar o mesmo valor.
11	<p>Nesta questão os itens deverão ser somados, porém os itens b e d deverão seguir a seguinte pontuação:</p> <p>Se a resposta for 1, o valor será (5)</p> <p>Se a resposta for 2, o valor será (4)</p> <p>Se a resposta for 3, o valor será (3)</p> <p>Se a resposta for 4, o valor será (2)</p> <p>Se a resposta for 5, o valor será (1)</p>

Fase 2: Cálculo do Raw Scale

Nesta fase você irá transformar o valor das questões anteriores em notas de 8 domínios que variam de 0 (zero) a 100 (cem), onde 0 = pior e 100 = melhor para cada domínio. É

Grau	Avaliação
-------------	------------------

chamado de raw scale porque o valor final não apresenta nenhuma unidade de medida.

Domínio:

- Capacidade funcional
- Limitação por aspectos físicos
- Dor
- Estado geral de saúde
- Vitalidade
- Aspectos sociais
- Aspectos emocionais
- Saúde mental

Para isso você deverá aplicar a seguinte fórmula para o cálculo de cada domínio:

Domínio:

Valor obtido nas questões correspondentes – Limite inferior x 100

Variação (Score Range)

Na fórmula, os valores de limite inferior e variação (Score Range) são fixos e estão estipulados na tabela abaixo.

Domínio	Pontuação das questões correspondidas	Limite inferior	Variação
Capacidade funcional	03	10	20
Limitação por aspectos físicos	04	4	4
Dor	07 + 08	2	10
Estado geral de saúde	01 + 11	5	20
Vitalidade	09 (somente os itens a + e + g + i)	4	20
Aspectos sociais	06 + 10	2	8
Limitação por aspectos emocionais	05	3	3
Saúde mental	09 (somente os itens b + c + d + f + h)	5	25

Anexo 4 – Questionário WOMAC

Seção A

INSTRUÇÕES PARA OS PACIENTES

As perguntas a seguir se referem a intensidade da dor que você está atualmente sentindo devido a artrite de seu joelho. Para cada situação, por favor, coloque a intensidade da dor que sentiu nas últimas 72 horas (Por favor, marque suas respostas com um "X").

Pergunta: Qual a intensidade da sua dor?

1-Caminhando em um lugar plano.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

2- Subindo ou descendo escadas.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

3- A noite deitado na cama.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

4-Sentando-se ou deitando-se.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

5. Ficando em pé.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

Seção B

INSTRUÇÕES PARA OS PACIENTES

As perguntas a seguir se referem a intensidade de rigidez nas juntas (não dor), que você está atualmente sentindo devido a artrite em seu joelho nas últimas 72 horas. Rigidez é uma sensação de restrição ou dificuldade para movimentar suas juntas (Por favor, marque suas respostas com um "X").

1. Qual é a intensidade de sua rigidez logo após acordar de manhã?

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

2. Qual é a intensidade de sua rigidez após se sentar, se deitar ou repousar no decorrer do dia?

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

Seção C

INSTRUÇÕES PARA OS PACIENTES

As perguntas a seguir se referem a sua atividade física. Nós chamamos atividade física, sua capacidade de se movimentar e cuidar de você mesmo(a). Para cada uma das atividades a seguir, por favor, indique o grau de dificuldade que você está tendo devido à artrite em seu joelho durante as últimas 72 horas (Por favor, marque suas respostas com um "X").

Pergunta: Qual o grau de dificuldade que você tem ao:

1 - Descer escadas.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

2- Subir escadas.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

3- Levantar-se estando sentada.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

4- Ficar em pé.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

5- Abaixar-se para pegar algo.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

6- Andar no plano.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

7- Entrar e sair do carro.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

8- Ir fazer compras.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

9- Colocar meias.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

10- Levantar-se da cama.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

11- Tirar as meias.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

12- Ficar deitado na cama.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

13- Entrar e sair do banho.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

14 - Se sentar.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

15- Sentar e levantar do vaso sanitário.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

16- Fazer tarefas domésticas pesadas.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

17- Fazer tarefas domésticas leves.

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

Anexo 5 – Percepção subjetiva do esforço (PSE)_Escala de Borg

Nota	Sensação
6	-
7	muito fácil
8	-
9	fácil
10	-
11	relativamente fácil
12	-
13	ligeiramente cansativo
14	-
15	cansativo
16	-
17	muito cansativo
18	-
19	exaustivo
20	-